

ABCB1 transzporterek vizsgálata multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtekben

Ph.D. ÉRTEKEZÉS

Sike Ádám

Témavezető: Prof. Dr. Boros Imre
tanszékvezető egyetemi tanár

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged

2014

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
1.1. A rákos megbetegedések előfordulása, társadalmi terhei és költségei	7
1.2. A daganatos betegségek kezelésének terápiás lehetőségei	7
1.3. A multidrog rezisztencia	8
1.3.1. A szerzett multidrog rezisztencia	9
1.4. Az ABC transzporter fehérje szupercsalád	9
1.4.1. Az ABCB1 transzporter felfedezése	10
1.4.2. Az ABC transzporterek szerkezete	10
1.4.3. Az ABC transzporterek működése	12
1.4.4. A membrán szerepe a drog effluxban	13
1.4.5. Az ABCB1 transzporter fiziológiás előfordulása, szerepe	14
1.4.6. Az ABCB1 transzporter szerepe a multidrog rezisztenciában	14
1.4.7. Az ABCB1 transzkripciójának szabályozása	15
1.5. Epigenetika	16
1.5.1. Hiszton acetiláció, HAT és HDAC enzimek	18
1.5.2. Az epigenetika szerepe az MDR1 expresszióban	19
1.5.2.1. A DNS metiláció szerepe az ABCB1 expresszióban	20
1.5.2.2. A hiszton acetiláció szerepe az ABCB1 expresszióban	21
1.5.2.3. A DNS metiláció és a hiszton acetiláció kapcsolata	21
1.5.2.4. A kemoterápia hatására bekövetkező epigenetikai változások	23
1.5.3. Hiszton deacetiláz inhibitorok	23
1.5.3.1. A hiszton deacetiláz inhibitorok alkalmazása a rákterápiában	24
1.5.3.2. A hiszton deacetiláz inhibitorok hatása az ABCB1 expressziójára	25
1.6. <i>Abcb1</i> gén a rágcsőókban	28

2. CÉLKITŰZÉSEK	29
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
3.1. Sejtek tenyésztése	30
3.2. Multidrog-transzporterek aktivitásának meghatározása	30
3.3. Össz RNS-izolálás és egyes szálú cDNS-szintézis	31
3.4. Génexpresszió meghatározása kvantitatív valós idejű PCR (QPCR) módszerrel	31
3.5. Genomi DNS izolálás	33
3.6. RNS stabilitás meghatározása	33
3.7. A szabályozó régiók szekvenciájának meghatározása	33
3.8. Az <i>Abcb1</i> gének szabályozó régióinak beépítése luciferáz riporter gént tartalmazó plazmidba	34
3.9. Riporter plazmidok tranziens transzfekciója és luciferáz aktivitás mérés	34
3.10. Western blot	35
3.11. Kromatin immunoprecipitáció (ChIP)	36
3.12. Statisztikai analízis	37
4. EREDMÉNYEK	38
4.1. A multidrog rezisztens sejtek megnövekedett ABCB1 és csökkent ABCC1 transzporter aktivitást mutatnak	38
4.2. A rezisztens sejtekben megemelkedett az <i>Abcb1a</i> és az <i>Abcb1b</i> mRNS szintje	40
4.3. A drog-rezisztens sejtekben az ABCB1b fehérjék szintje is magasabb	41
4.4. A megemelkedett <i>Abcb1</i> RNS expressziót nem az őket kódoló	

gének amplifikációja okozza	42
4.5. A drog-rezisztens sejtekben stabilabb az <i>Abcb1b</i> mRNS	43
4.6. A megemelkedett <i>Abcb1a</i> és <i>Abcb1b</i> expresszióért elsődlegesen a transzkripciójuk aktivációja felelős	45
4.7. A D12, col500 és col1000 sejtvonalak <i>Abcb1a</i> és <i>Abcb1b</i> szabályozó régióinak összehasonlítása	46
4.8. Az <i>Abcb1</i> promóter fragmentumok hasonló aktivitást mutatnak a drog-szenzitív és a drog-rezisztens sejtvonalakban	47
4.9. Az <i>Abcb1</i> gének szabályozó régióiban az acetilált hiszton 3 lizin 9 (H3K9ac) oldalláncok mennyisége hasonló a szenzitív és a rezisztens sejtekben	48
4.10. A két <i>Abcb1</i> gén eltérően reagál hiszton deacetiláz inhibitor (HDACi) kezelésre	50
4.11. A HDACi kezelés nem befolyásolja az ABCB1 és ABCC1 pumpák aktivitását	53
5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	55
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	65
ÖSSZEFOGLALÓ	66
SUMMARY	71
IRODALOMJEGYZÉK	76
TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	83
FÜGGELÉK	84

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC:	adenosine triphosphate binding cassette
ABCB1:	adenosine triphosphate binding cassette, sub-family B member 1
ABCC1:	adenosine triphosphate binding cassette, sub-family C member 1
ABCG2:	adenosine triphosphate binding cassette, sub-family G member 2
ATP:	adenozin trifoszfát
BSA:	borjú szérumbalbumin
ChIP:	kromatin immunoprecipitáció
DSP:	downstream promóter
EDTA:	etilén-diamin tetraecetsav
FACS:	fluorescence-activated cell sorting
FBS:	magzati borjú szérumbalbumin
GFP:	zöld fluoreszcens protein
HAT:	hiszton acetiltranszferáz
HDACi:	hiszton deacetiláz inhibitor
MAF:	multidrog rezisztencia aktivitás faktor
MDR:	multidrog rezisztencia
MDR1:	multidrug resistance protein 1
MED-1:	multiple start site element downstream 1
MRP-1:	multidrug resistance-associated protein 1
NBD:	nukleotid kötő domén
NF-Y:	nuclear factor Y
PBS:	foszfáttal pufferolt sóoldat
PCAF:	P300/CBP-associated factor
P-gp:	permeability glycoprotein
QPCR:	kvantitatív valós idejű PCR

SDS:	nátrium dodecilszulfát
SUMO:	small ubiquitin-related modifier
TBS:	tris-pufferolt sóoldat
TMD:	transzmembrán domén
TSA:	trichostatin A
USP:	upstream promóter
YB1:	Y-box-binding protein

1. BEVEZETÉS

1.1. A rákos megbetegedések előfordulása, társadalmi terhei és költségei

A fejlett társadalmakban a születéskor várható átlagéletkor folyamatosan emelkedik, azonban ezzel párhuzamosan számos, a korábbi évszázadokban csak jóval kisebb számban előforduló krónikus betegség is megjelent. Ezek közül a daganatos megbetegedések előretörése igen figyelemre méltó. 2008-ban világszerte 7.6 millió ember esett áldozatul valamilyen rákos megbetegedésnek, ezek közül férfiak esetén a tüdőrák (23 %), nők esetén a mellrák (14 %) a vezető halálok [1]. A WHO becslése alapján ez a szám tovább növekszik, 2030-ra elérheti a 13.1 milliót. A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint 2012-ben Magyarországon 129 440 ember hunyt el, közülük 33 224-en rákos megbetegedésben. A számokból kiolvasható, hogy az összes haláleset kb. 25%-át a daganatos betegségek adták, a szív- és keringési rendszert érintő betegségek mögött „elnyerve” ezzel a második helyet eme kétes értékű listán.

A rákos megbetegedések továbbá jelentős anyagi kiadásokat is okoznak. A költségek két részre oszthatók fel: közvetlen (megelőzés, kórházi ellátás, gyógyszerek) és közvetett (betegszabadság, korai nyugdíjazás, halál) költségekre. A kiadások kb. 80 %-át a közvetett költségek teszik ki, melyek 2008-ban 895 milliárd USA dollárra rúgtak világszerte, ez a világ GDP-jének 1.5 %-a. Magyarországon még rosszabb volt a helyzet: az ország GDP-jének 3.05 %-át költötte a rákos megbetegedések okozta közvetlen költségekre a 2008-as esztendőben.

A fenti tények ismeretében kijelenthető, hogy a rákos megbetegedések megelőzése, kezelése és gyógyítása az emberiség egyik igen aktuális problémája, mely azonban óriási kihívást is jelent a kutatók és orvosok számára.

1.2. A daganatos betegségek kezelésének terápiás lehetőségei

A daganatos megbetegedések kezelésére három fő stratégiát alkalmaznak az orvostudományban: sebészi beavatkozást, sugárterápiát valamint a klasszikus gyógyszeres kezelést (kemoterápia). A modern gyógyászatban eme 3 fő irány mellett próbálkoznak még célzott terápiával [2], immunterápiával [3], hormonterápiával (emlő és prosztatata tumorok esetében) [4, 5] valamint angiogenezis-gátlókkal [6] is. A daganat kiindulási helyét,

szöveti sajátságait, valamint a páciens életkorát és általános állapotát figyelembe véve döntenek az orvosok az egyes kezelések önálló, vagy azok valamilyen kombinációjának alkalmazásáról. A terápia végső célja minden esetben az összes rákos sejt elpusztítása/eltávolítása, az egészséges sejtek lehető legkisebb károsítása mellett. A klasszikus kemoterápiás kezelés során alkalmazott gyógyszerek (citotoxikumok) a daganatsejtek osztódásának gátlását, azok elpusztítását célozzák. Ezen anyagok egy része növényi eredetű, míg mások szintetikusak. Hatásmechanizmusok szerint 3 fő csoportra oszthatók: nukleotid bioszintézis gátlók (anti-metabolitok), genotoxikus ágensek és mitózis gátlók. Már a 60-as évek során megfigyelték, hogy növelhető a kemoterápiás kezelés sikeressége, ha különböző kemoterápiás szereket egyidejűleg alkalmaznak [7]. A citotoxikus szerek relatíve széles hatásspektruma miatt a kemoterápiás kezelés durva és nem-specifikus beavatkozásnak számít, amit csupán rövid ideig képes tolerálni a szervezet. Mivel ezek a szerek kifejezetten a gyorsan osztódó sejtek (a ráksejtek ilyenek) pusztulását okozzák, a tumorsejtek mellett a gyorsan osztódó egészséges sejteket is károsíthatják, ezáltal igen súlyos mellékhatásokat okozhatnak: befolyásolhatják a vérképzést, hányingert, nyálkahártya-károsodást idézhetnek elő, hajhullást és bőrelváltozásokat, levertséget és rossz közérzetet eredményezhetnek. Mivel a kezelés előnyei még így is jelentősebbek az azt kísérő mellékhatásoknál, ezért a gyógyszeres terápia az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a rák elleni küzdelemben, bár ez inkább egy jobb és hatékonyabb alternatíva hiányát, mintsem a kemoterápia hatékonyságát tükrözi [8, 9].

1.3. A multidrog rezisztencia

A sikeres rákterápia kulcsa az alkalmazott kemoterápiás szerek hatékonysága akár egyedül akár sugárterápiával vagy sebészeti eljárással kombinálva. A daganatos betegek kemoterápiás kezelése azonban gyakran kudarcba fullad, aminek fő oka a tumorok citotoxikus szerekkel szemben mutatott úgynevezett multidrog rezisztencia fenotípusa [10]. Úgy tartják, hogy a sikertelen kemoterápiás kezelések 90%-a a MDR-val hozható kapcsolatba [11]. Megfigyelték, hogy egyes esetekben a tumor egyáltalán nem reagált az alkalmazott kezelésre, tehát már a kemoterápiás szerrel való találkozás előtt drog-rezisztensnek tekinthető, ezt nevezzük elsődleges vagy természetes multidrog rezisztenciának. Más esetekben a kemoterápiás kezelésre kezdetben jól reagáló, a citotoxikus anyagra érzékeny daganat később ellenállóvá vált a terápia során alkalmazott gyógyszerrel szemben, így módon okozva a kemoterápia kudarcát, ez a jelenség a szerzett multidrog rezisztencia [10-17]. Tovább súlyosbítja a helyzetet az, hogy sok esetben a tumor nem csak az eredeti droggal szemben,

hanem több más, szerkezetükben és hatásmechanizmusukban különböző kemoterápiás szerrel szemben is keresztrezisztenciát mutathat [11].

1.3.1. A szerzett multidrog rezisztencia

A szerzett multidrog rezisztencia kialakulásáért számos sejtes mechanizmus tehető felelőssé. Ezeket két fő kategóriába lehet besorolni: az ún. nem-klasszikus illetve a transzport-alapú klasszikus mechanizmusok. A nem-klasszikus mechanizmusok közé sorolhatjuk a drog-inaktivációt [18], a drog célmolekuláját érintő változásokat (megváltozott expressziós szint, mutáció) [19] valamint a drog-indukálta apoptózis elkerülését [20], míg a klasszikus MDR alatt a kemoterápiás szerek sejtből való eltávolítását értjük, amit különböző transzport fehérjék hajtanak végre [13, 21].

A szerzett multidrog rezisztencia klasszikus, transzport alapú kialakulása során a kemoterápiás szereket különböző, energia-függő membrán transzporter fehérjék távolítják el a rákos sejtől, biztosítva ezáltal, hogy a drogok nem érik el a terápiás koncentrációjukat a sejten belül. Ezek a pumpák az ABC-transzporter (**A**TP-**B**inding **C**asette) fehérje szupercsalád tagjai, melyek evolúciósan rendkívül konzerváltak, a prokariótáktól egészen az emberig megtalálhatóak [22]. Fiziológias szerepük többek között a sejtekbe bejutott különböző mérgeanyagok gyors és hatékony eltávolítása, ezáltal a sejt túlélésének biztosítása. Groteszk módon a rákos sejtek ezt a természetes védekező mechanizmust kihasználva, azt a maguk javára fordítva biztosítják saját túlélésüket.

1.4. Az ABC transzporter fehérje szupercsalád

Az ABC transzporterek alkotják a transzmembrán fehérjék legnagyobb családját [22]. Működésük során az ATP megkötéséből és annak hidrolíziséből nyert energiát használják fel a legkülönbözőbb anyagok membránon keresztüli (többnyire) egyirányú szállításához. Funkciójukat tekintve lehetnek importerek, ekkor a sejt működéséhez szükséges tápanyagokat és egyéb molekulákat szállíthatnak a sejtekbe, vagy exporterek, ekkor többek között toxinokat, mérgeanyagokat, lipideket pumpálhatnak a citoplazmából a sejten kívülre. Habár az ABC transzporterek az összes eddig ismert taxonban előfordulnak, az importerek csak prokariótákban, az exporterek prokariótákban és eukariótákban is megtalálhatóak [23]. Az emberi genom 49 ABC transzporter fehérjét kódol (ezekből 48 működőképes), melyeket az őket kódoló gének szerkezete valamint a fehérjék doménjeinek sorrendje és azok

szekvenciájának homológiája alapján 7 alcsaládba sorolnak be, A-tól G-ig [24]. Az ún. klasszikus/transzporter alapú mechanizmusok különösen fontos szerepet játszanak a multidrog rezisztencia kialakulásában, ebben elsősorban az ABC-fehérjék ABCB (ABCB1/MDR1/P-glikoprotein), ABCC (ABCC1/MRP1; ABCC2/MRP2) valamint ABCG (ABCG2/MXR/BCRP) alcsaládjainak zárójelben említett tagjai vesznek részt [23]. Mivel ezek közül először az ABCB1 fehérjét fedezték fel, ezért a rendelkezésre álló adatok jelentős része ehhez a fehérjéhez kapcsolódik. A dolgozat következő részében az ABC transzporterek sajátosságait az ABCB1 transzporter jellemzésén keresztül mutatom be.

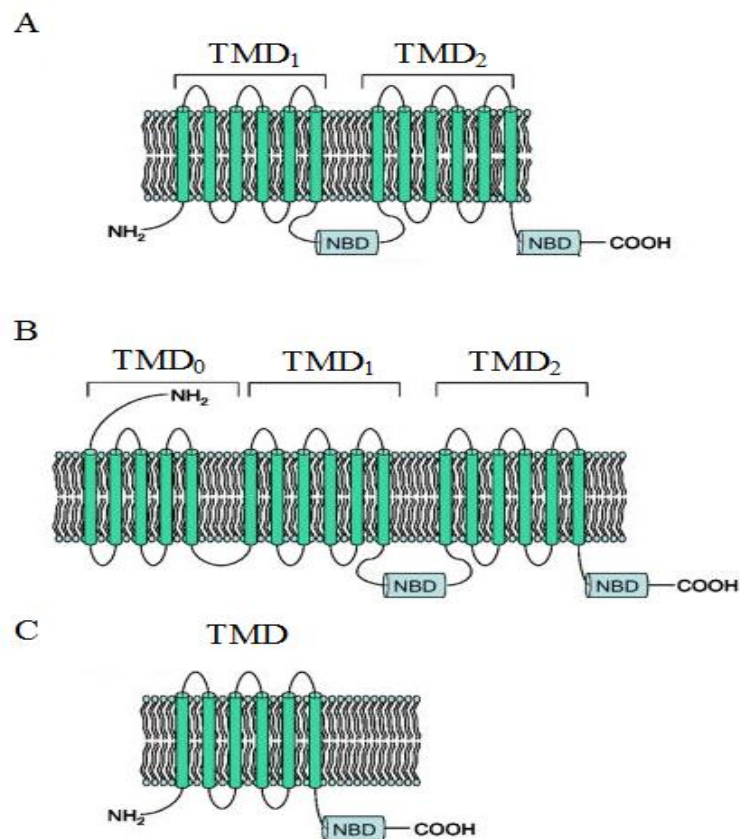
1.4.1. Az ABCB1 transzporter felfedezése

Juliano és munkatársai multidrog rezisztens kínai hörcsög petefészek sejtvonal vizsgálata során azt találták, hogy azok membránjában egy, a vad típusú sejtekben nem kimutatható, 170 kDa méretű fehérje jelent meg, melynek mennyisége korrelált a drog rezisztencia mértékével. A fehérjét P-glikoproteinnak nevezték el [25]. Egy évtizeddel később sikerült bebizonyítani, hogy a fehérjét az ABCB1 (MDR1) gén kódolja [26]. A humán ABCB1 (MDR1, P-glikoprotein, P-gp) 10 másik fehérjével együtt az ABC transzporterek B alcsaládjának tagja. A humán ABCB1 gén a 7. kromoszómán található, 28 exonból áll, a róla képződő fehérje 1280 aminosav hosszúságú. Az ABCB1 szubsztrátspecifitása igen széles, képes felismerni és szállítani egymástól nagyon különböző kémiai osztályokba tartozó anyagokat. Általánosságban elmondható, hogy kationos amfipatikus és hidrofób vegyületeket transzportál, melyek molekulatömege 300-2000 Da tartományba esik. Szubsztrátjai többek között kemoterápiás (anthracyclinek, vinca alkaloidok, antimitotikumok, taxánok, epipodophyllotoxinok, camptotecinek, anthracének) és antiepileptikus szerek, HIV proteáz-gátlók, antibiotikumok, antidepresszánsok, immunszuppresszánsok, vérnyomáscsökkentők, calmodulin antagonisták, antihisztaminok és más egyéb gyógyszerek is [27].

1.4.2. Az ABC transzporterek szerkezete

Az ABC-transzporterek nevüket az erősen konzervált, 200-250 aminosav hosszúságú, intracelluláris elhelyezkedésű ATP-kötő (vagy más néven NBD- nucleotid binding domain) doménjükről kapták [28], mely képes az ATP megkötésére és hidrolízisére, ezáltal biztosítva a transzporthoz szükséges energiát. A NBD további 2 alegységre osztható fel. A katalitikus core domén tartalmazza a glicinben gazdag Walker A motívumot (P-loop); egy glutaminban

gazdag szekvenciát (Q-loop); a Walker B motívumot valamint a H (His-switch), A és D motívumokat. A másik alegység a szerkezetileg kevésbé konzervált α -helikális domén, ami az ABC szupercsaládra jellemző, ABC-signature motívumot (C-loop) hordozza [29, 30]. Az ABC transzporterek tartalmazznak még transzmembrán domént (TMD), melyet leggyakrabban 6 (számuk 5-10-ig terjedhet) transzmembrán α -hélix alkot. Mivel a TMD-ek ismerik fel és juttatják át a membránon a különböző szubsztátokat, ezért ezek szerkezetükben és szekvenciájukban rendkívül variábilisak, azonban feltekeredésük mintázata alapján 3 osztályba sorolhatjuk őket: I. és II. típusú ABC importerek valamint ABC exporterek [31]. Egy funkcionálisan aktív ABC transzporter minimum 2 ATP-kötő és 2 transzmembrán domént kell, hogy tartalmazzon. Az úgynevezett teljes ABC pumpák, mint például az ABCB1, egy fehérjeláncon tartalmazzák mind a négy szükséges elemet (1. A ábra), míg a fél ABC pumpák (pl. ABCG2) csupán egy ATP-kötő kazettát és egy transzmembrán domént tartalmazznak (1.C ábra). Az utóbbi típusba tartozó pumpák csak homo- illetve heterodimer formában aktívak [23]. Az ABCC alcsalád néhány tagja egy harmadik transzmembrán domént hordoz az N-terminális részen („hosszú transzporterek”) [32] (1.B ábra). A fentieket összefoglalva elmondható, hogy az ABC fehérjék domén-elrendezése változatos képet mutat az egyes alcsaládok között/alcsaládokon belül.



1. Ábra Az ABC transzporterek szerkezete (A) Teljes ABC transzporter (B) Hosszú ABC transzporter (C) Fél-ABC transzporter

Fukuda, 2012 alapján módosítva

1.4.3. Az ABC transzporterek működése

Az ABC transzporterek működését 2 ciklusra lehet osztani: a NBD-ek ATP katalitikus ciklusára, valamint a TMD-ek ligand transzport ciklusára. A katalitikus és a transzport ciklusok pontos mechanizmusa, valamint az egymással való kapcsolatuk az elmúlt évtizedek intenzív kutatómunkája ellenére sem teljesen ismertek. Hiába ismerjük ma már több mint 10 ABC transzporter kristályszerkezetét, mivel ezek csak „pillanatfelvételek”, ezért egyedül nem alkalmasak arra, hogy a teljes transzportfolyamatot megértsük belőlük. A nukleotid kötő domének konformációs változásai, melyek a nukleotid-mentes nyitott és az ATP-kötött zárt állapot közötti átkapcsolásért felelősek, a családon belül konzerváltak. A transzmembrán domének 3 osztálya különböző mechanizmusok segítségével kapcsolja össze a NBD-ek

konformáció változását a ligand transzportjával [33]. Az ABC transzporterek működésének leírására több kutatócsoport több, néhány esetben egymásnak ellentmondó modellt állított fel. A mai napig vita tárgyát képezi, hogy a szubsztrát molekula transzportjához vezető konformáció-változáshoz szükséges energiát vajon az ATP kötődése vagy az ATP hidrolízise biztosítja. Az előbbi Higgins és munkatársai az ún. ATP-kapcsoló (ATP switch) modellel írták le [34]. A modellt, mely szerint az ATP hidrolíziséből származó energia hajtja a transzportot, Sauna és csoportja fogalmazta meg [35]. Vita tárgyát képezi továbbá, hogy vajon a két nukleotid kötő domén fizikailag eltávolodik egymástól a ciklus során, ahogy azt az ATP switch modell feltételezi, vagy esetleg folyamatosan kapcsolatban vannak egymással, mint ahogy azt az ún. állandó kapcsolat (Constant Contact) modell [36] feltételezi.

A fentiek ismeretében elmondható, hogy az ATP transzporterek működésének pontos megértéséhez és egy mindenki által elfogadott modell leírásához a rendelkezésünkre álló biokémiai, biofizikai és szerkezeti tanulmányokból született adatok nem elégségesek és egyértelműek, ehhez további kísérletek szükségesek.

1.4.4. A membrán szerepe a drog effluxban

Mivel az ABCB1 által szállított molekulák tipikusan lipofil, hidrofób karakterűek, a lipid kettősrétegnek fontos szerepe van a sejtből történő eltávolításukban. A Higgins által megfogalmazott, és manapság széles körben elfogadott modell szerint a P-gp, mint egy „hidrofób porszívó” működik, a hidrofób molekulákat már a lipid kettős rétegben felismeri és megköti, majd a sejten kívüli térbe szállítja, anélkül hogy azok belépnének a citoplazmába [37]. A modellt mind szerkezeti (az egér ABCB1 fehérjéjének transzmembrán szubsztrátkötő ürege a membrán belső rétege felé is nyitott), mind kísérleti (fluoreszcens szubsztrátokkal végzett lokalizációs kísérletek) megfigyelések is alátámasztják [38]. Ugyanakkor Higgins azt is feltételezte, hogy az ABCB1 flippázként is működhet, miszerint a szubsztrátot a membrán citoplazmatikus rétegéből a külső rétegébe helyezi át. A két modell nem zárja ki egymást, a szubsztrát elengedésének pillanatában a kötőhely az extracelluláris tér és a membrán külső rétege felé is nézhet, és a szubsztrát a hidrofóbicitásának mértékétől függően kerül közvetlenül a sejten kívülre vagy a membrán külső rétegébe [37].

1.4.5. Az ABCB1 transzporter fiziológiás előfordulása, szerepe

Habár az MDR1-et először rákos sejtekben mutatták ki, később bebizonyosodott, hogy normál szövetekben is megtalálható. Az MDR1 fehérje szöveti eloszlásának tanulmányozása során azt tapasztalták, hogy a legtöbb vizsgált szövetben csak kis mennyiségben fordul elő, nagy mennyiségben csupán kevés helyen található meg. Magas MDR1 fehérje szintet detektáltak különböző, kiválasztó funkcióval rendelkező szövetekben, mint például a vastag- és vékonybél villusait borító epitél sejtek apikális felszínén, a vese proximális tubulusaiban, a májsejtek epevezeték felőli oldalán, a kis epevezetékek és hasnyálmirigy kis vezetékeinek epitél sejtjeinek apikális felszínén, valamint a mellékvesében és a vér-szövet gátak (vér-agy gát, vér-here gát, méhlepény) endotél sejtjeiben is [39, 40]. A hematopoetikus őssejtekben alacsonyabb expresszióját mutatták ki [41]. Az előbb bemutatott anatómiai elhelyezkedése révén a P-glikoprotein három fő védelmi vonal révén védi a szervezetet a különböző mérgeanyagoktól. Elsőként a vastag- és vékonybelek epitél sejtjeinek apikális felszínén limitálja a szájon át bejutott xenobiotikumok bekerülését a szervezetbe. Amennyiben a mérgeanyagok mégis bekerültek a vérkeringésbe, a májban és a vesékben az ABCB1 elősegíti azok eltávolítását az epébe és a vizeletbe. Végül ha a xenobiotikumok a szisztémás vérkeringésbe is bejutottak, akkor az MDR1 megakadályozza azok bekerülését az érzékeny szövetekbe (agy, here, magzati keringés) [42].

A xenobiotikumok elleni védekezés mellett, az ABCB1 szerepet játszik endogén molekulák és anyagcsere termékek szállításában is. Lehetséges szubsztrátjai között tarják számon a foszfo- és glikolipideket, vérlemezke aktiváló faktorokat, β -amyloid peptideket és az interleukineket. Szerepe van a szteroid hormonok, mint az aldoszteron és progeszteron mellékveséből történő exportjában. Azonban kevés információ áll rendelkezésünkre ezen molekulák P-gp mediálta transzportjának *in vivo* mértékéről [27].

1.4.6. Az ABCB1 transzporter szerepe a multidrog rezisztenciában

Az évek során bebizonyították, hogy az ABCB1 számos kemoterápiás szer, mint például a vinca alkaloidok, taxánok, anthracyclinek, antimitikumok, epipodophyllotoxinok, camptotecinek, anthracének sejtől való eltávolításáért felelős. Túltermelését nem csak kísérleti tumor modellekben, hanem rákos betegekből nyert tumorszövetekben is gyakran

kimutatták. A fiziológias szöveti eloszlását ismerve nem meglepő, hogy a vastag- és vékonybél, vese, máj, mellékvese és hasnyálmirigy eredetű kezeletlen, természetes rezisztenciát mutató daganatokban megemelkedett MDR1 szintet detektáltak [43]. Ezen korai tanulmányok alapján reménykedtek abban, hogy a magas MDR1 expresszió önmagában magyarázatot ad a tumorok drog-rezisztenciájára. Azonban hamar bebizonyosodott, hogy a helyzet korán sem ilyen egyszerű: ezen daganatok nem MDR1-szubsztrát drogokkal való kezelése nem járt sikerrel, jelezve, hogy egyéb faktorok is szerepet játszanak a rezisztencia kialakulásában [44]. Emellett megfigyelték, hogy bizonyos tumorokban, mint például leukémia, mellrák, petefészekrák, kissejtes tüdőrák, melyek eredendően nem mutattak magas ABCB1 expressziót, a kemoterápiás kezelés után megnőtt a fehérje szintje [45]. A jelenség magyarázatára több elmélet is napvilágot látott. A szelekciós modell szerint a tumorban található, magas MDR1 szinttel rendelkező szubpopuláció a kemoterápiás kezelés hatására túlnövi a szenzitív sejtpopulációt [46]. Az aktivációs modell az MDR1 gén drog-indukálta direkt aktivációjával magyarázza a magas MDR1 fehérje szintet [47], míg Yague és munkatársai a megemelkedett expressziót az ABCB1 mRNS stabilitásának növekedésével hozták összefüggésbe [48].

Az elmúlt 30 év klinikai adatai alapján elmondható, hogy a rákos sejtek magas MDR1 fehérjeszintje és a kemoterápiás kezelések sikertelensége között gyakran pozitív korreláció fedezhető fel, emiatt az MDR1 transzporter aktivitásának/expressziójának gátlása a rákkutatás egyik fontos területe. Mivel a transzporter farmakológiai gátlására irányuló törekvések az évek során az ígéretes pre-klinikai tesztek után a klinikumban sorra kudarcba fulladtak, így az ABCB1 gén szabályozásának minél pontosabb megértése talán egy napon közelebb vihet a multidrog-rezisztencia legyőzéséhez.

1.4.7. Az ABCB1 gén szabályozása

Az elmúlt évek intenzív kutatása rámutatott, hogy az ABCB1 gén szabályozása igen bonyolult folyamat, köszönhetően a promóter régiójában megtalálható számtalan response-elemnek és az ezekhez kapcsolódó transzkripciós faktorok sokféleségének. Ezek a szekvencia specifikus transzkripciós faktorok kulcsszerepet játszanak az RNS polimeráz II-t tartalmazó preiniciációs komplex összeszerelődésében, valamint a kromatinszerkezetet fellazító hiszton

módosító- és kromatin remodelling komplexek kapcsolódásában. Az önmagában is összetett alap transzkripció még tovább bonyolódhat, ha a sejtnak alkalmazkodnia/válaszolnia kell valamilyen speciális tényező (stresszhatás, metabolizmus, fejlődési stádium) megjelenésére.

A humán MDR1 két promóterről íródik át [49]. A transzkriptumok túlnyomó többsége a downstream promóterről (DSP) származik [50], míg a távolabbi (112 kb távolságra a DSP-től) upstream promóter (USP) csupán néhány drog-rezisztens sejtben aktív [51]. Emiatt a DSP került a vizsgálatok fókuszába, aminek köszönhetően felépítéséről és működéséről rengeteg adat áll rendelkezésünkre. Ellentétben a humán promóterek többségével, az ABCB1 promótere nem rendelkezik TATA box-szal, helyett a transzkripció az úgynevezett iniciátor (Inr) elemről indul, melyet a transzkripciós start helyhez (+1) képest a -6 és +11 régióra lokalizáltak [52]. Ezen felül megtalálhatjuk még a TATA-box nélküli promóterekre jellemző szekvenciák közül a fordított CCAAT-elemet, vagy más néven Y-box-ot (-79- -75) [53], mely az NF-Y és YB-1 transzkripciós faktorokkal hat kölcsön [54, 55], valamint egy GC-gazdag szekvenciát (-56- -43), melyhez az Sp család tagjai (Sp1 és Sp3) kötődnek [56]. Upstream irányban egy újabb GC-gazdag szekvencia helyezkedik el (-110- -103), ide is valószínűleg az Sp család tagjai kötődnek. A szekvencia részben átfed egy fordított MED-1 (multiple start site element downstream 1) elemmel (-105- -100), mely az LRP116 fehérjével kölcsönhatva aktiválja az MDR1 gént [57].

Az ABCB1 szabályozásában a fenti, alap expressziót biztosító promóter elemek és transzkripciós faktorok mellett számos más faktor (a teljesség igénye nélkül: tumor szupresszorok [58], onkogének [59], hősokk-faktor [60], hipoxia-indukálta faktor [61], nukleáris receptor [62]) is szerepet játszik, így téve azt rendkívül összetett és bonyolult folyamattá.

1.5. Epigenetika

Kezdetben a rákos sejtek MDR1 gén túltermelésének mechanizmusaira vonatkozó vizsgálatok (tranzienst transzfekciós kísérletek, riporter alapú vizsgálatok) elsősorban a promóter cisz-szabályozó elemeire és az azokhoz kapcsolódó transzkripciós faktorokra fókuszáltak. Ezek segítségével számos szabályozó régiót és kölcsönható fehérjét azonosítottak, melyek szerepet játszanak mind az MDR1 konstitutív (nem indukált), mind a

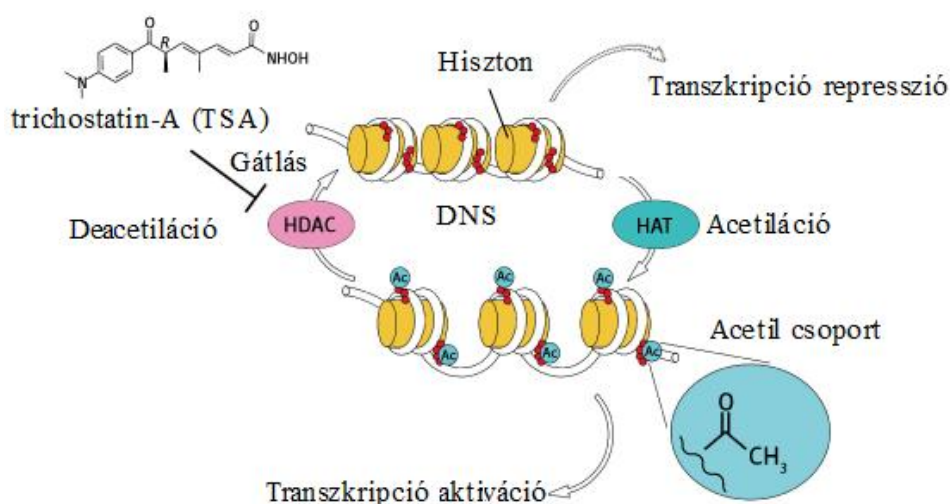
2. Ábra A fő epigenetikai faktorok A hiszton fehérjék poszt-transzlációs módosításai, a DNS metilációja és a kis, nem-kódoló RNS-ek.

1.5.1. Hiszton acetiláció, HAT és HDAC enzimek

A nukleoszómákat felépítő hiszton fehérjék egy globuláris C-terminális és egy struktúrálatlan, flexibilis N-terminális résszel rendelkeznek [64]. A hisztonok N-terminális „farki” doménjei, melyek kilógnak az oktamer nukleoszóma magból, különféle poszttranszlációs kémiai módosításokon mehetnek keresztül. Ezek a módosítások szerepet játszanak a transzkripció, replikáció, DNS hibajavítás és kromatin kondenzáció szabályozásában. Ezeket a folyamatokat a hiszton módosítások két különböző mechanizmuson keresztül is befolyásolhatják. Egyrészt, a módosítások megváltoztatják a hiszton-DNS, valamint a hiszton-hiszton kölcsönhatásokat, így módosítva a kromatinszerkezetet, másrészt kötőhelyet biztosítanak különböző, nem-hiszton fehérjék (pl. transzkripciós aktivátorok, represszorok) számára. Az eltérő módosítás kombinációk így más-más effektor fehérjék kapcsolódását eredményezik a kromatinhoz, így szabályozva a DNS-függő folyamatok végbemenetelét [65]. A különböző módosítások a farki domének különböző pontjain mehetnek végbe. Acetiláció lizinen, metiláció lizinen és argininen, foszforiláció szerinen, treoninon és tirozinon, ADP-ribosiláció glutaminsavon, SUMO-iláció lizinen és ubiquitináció szintén lizinen figyelhető meg [65].

A hiszton fehérjék egyik legintenzívebben tanulmányozott kovalens módosítása az acetiláció, melyet már 1964-ben megfigyeltek, és fontos szerepet tulajdonítanak neki a transzkripció szabályozásában: jelenléte általában aktív génátírással jár együtt [66]. A hisztonok acetilációja elsődlegesen a nukleoszómális H3 és H4 fehérjék N-terminális farki doménjeinek lizin aminosav oldalláncain történik. Dinamikus egyensúlyának fenntartása két enzimes család ellentétes működésén keresztül megy végbe (3. ábra). A hiszton acetiltranszferáz (HAT) enzimek a hisztonok acetilációjáért, míg a hiszton deacetilázok (HDAC) az acetil csoport eltávolításáért felelősek. A HAT enzimek az acetil koenzim-A molekuláról egy acetil csoportot helyeznek a hisztonok lizin aminosavainak ϵ -amino csoportjaira. Ennek eredményeképp semlegesítik a lizin pozitív töltését, így gyengítve a hiszton-DNS kölcsönhatást, elősegítve a kompakt kromatin struktúra fellazulását. További HAT-ok, kromatin remodelling komplexek és transzkripciós faktorok kötődése után ez a nyitottabb kromatinszerkezet lehetővé teszi a transzkripció iniciációját. A hiszton deacetiláz enzimek ezzel szemben az ellentétes reakciót katalizálják: eltávolítják az acetil csoportot a hisztonok N-terminális lizinjeiről, így azok visszanyerik pozitív töltésüket. Ennek köszönhetően a DNS

újból erősebben kapcsolódik a hiszton fehérjékhez, ami egy transzkripciósan inaktív, kompakt kromatin struktúra kialakulását idézi elő. Hasonlóan a HAT enzimekhez, a HDAC-ok is multiprotein komplexek tagjaiként látják el feladatukat. A hiszton deacetiláz enzimek gátlószerei, az ún. HDAC inhibitorok (ilyen pl. a trichostatin A) ígéretes tumor-ellenes hatással bírnak (részletesen lásd később).



3. Ábra A hiszton acetiláció-deacetiláció dinamikája HAT: hiszton acetiltranszferáz, HDAC: hiszton deacetiláz

Yoshida, 2008 alapján módosítva

Érdemes megjegyezni, hogy a HAT és HDAC enzimek a hisztonokon kívül nem-hiszton fehérjék (transzkripciós faktorok, citoskeletális fehérjék, nukleáris receptorok, molekuláris chaperonok) acetilációjáért-deacetilációjáért is felelősek [67].

1.5.2. Az epigenetika szerepe az MDR1 expresszióban

Az MDR1 gén transzkripciós aktivitásának szabályozását számos, a promóter konszenzus cisz-elemeihez kötődő transz-aktiváló fehérje látja el. A promóter elemek hozzáférhetőségét a hozzájuk kötődő faktorok számára a kromatinszerkezet befolyásolja. Az elmúlt bő egy évtized során számos bizonyíték napvilágot látott, miszerint az ABCB1

transzkripciójának összetett szabályozásában a DNS metiláció és a hiszton acetiláció is fontos szerepet játszik.

1.5.2.1. A DNS metiláció szerepe az ABCB1 expresszióban

Az MDR1 promóterében található CpG szigetek metilációs állapota összefüggést mutat a gén aktivitásával. Különböző rákos sejtvonalak és daganatokból származó sejtek vizsgálatából kiderült, hogy az MDR1 expresszió fordítottan arányos a promóter metiláltsági fokával: a drog-szenzitív sejtek promótere hipermetilált, míg a drog-rezisztens sejteké hipometilált állapotot mutatott [68, 69]. Kantharidis és munkatársai drog-szenzitív sejtek DNS-metiltranszferáz gátló 5-azaC reagenssel történő kezelése után azt tapasztalták, hogy a kezelés aktiválta az MDR1 expresszióját, és drog-rezisztenssé tette a sejteket [70]. Egyes tanulmányok azt sugallták, hogy a kemoterápiás kezelés hatással van az MDR1 promóterének metilációs állapotára. Ezt a következtetést azon megfigyelés alapján vonták le, miszerint a kemoterápiás kezelés eredményeképp csökkent a promóter CpG metilációja [71].

Annak ellenére, hogy a szakirodalomban fellelhető adatok döntő többsége a fenti koncepciót támasztja alá, találunk példát az ellenkezőjére is. Yatouji és kollégái drog-szenzitív és drog-rezisztens petefészekrák sejtek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy amíg az MDR1 fehérjét nem termelő szenzitív sejtek MDR1 promóterére alacsony CpG metiláció volt jellemző, addig a fehérjét termelő rezisztens sejtekben a promóter hipermetilált állapotban volt [72].

Zhang és munkatársai májkarcinóma sejtekben egy érdekes megfigyelést írtak le. A metil transzferáz aktivitással rendelkező EZH2 fehérje kiütésének hatására az MDR1 promóterében a metilációs szint megemelkedett, a gén expressziója pedig lecsökkent, holott ennek pont az ellenkezőjét várták. A jelenséget egyelőre nem tudták megmagyarázni [73].

1.5.2.2. A hiszton acetiláció szerepe az ABCB1 expresszióban

Régóta ismert, hogy a hiszton fehérjék acetilációja fontos szerepet játszik a transzkripció szabályozásában [66]. Az acetilációs szint dinamikus egyensúlyának fenntartásában szerepet játszó HAT és HDAC enzimek MDR1 expressziójára gyakorolt hatását Jin és Scotto humán vastagbél karcinóma sejtekben vizsgálták [74]. A sejteket HDAC inhibitor TSA-val kezelve az MDR1 génexpresszió aktivációját figyelték meg. A promóter régió vizsgálata során megállapították, hogy a TSA kezelés hatása a fordított CCAAT boxon keresztül érvényesült. Következő lépésben a HDAC aktivitás gátlása helyett a HAT aktivitás növelésével próbálkoztak: a PCAF hiszton acetiltranszferáz aktivitással rendelkező fehérje túltermelése szintén megemelkedett ABCB1 expressziót eredményezett. Az MDR1 expresszióját szabályozó számos transzkripciós faktor közül az NF-Y-t azonosították, mely szerepet játszik a TSA mediálta expresszió növekedésben. Ezt követően számos csoport számolt be arról, hogy különböző drog-rezisztens sejtek vizsgálata során az ABCB1 promóterében megemelkedett hiszton acetilációs szintet detektáltak, közülük Tóth és munkatársai nemrég megjelent publikációjukban specifikusan a hiszton 3 fehérje 9-es lizinjének (H3K9) megemelkedett acetilációs szintjét mutatták ki drog-rezisztens mellrák sejtekben [75].

1.5.2.3. A DNS metiláció és a hiszton acetiláció kapcsolata

A vizsgálatok során az is hamar nyilvánvalóvá vált, hogy a DNS metiláció és a hiszton acetiláció szorosan együttműködik az MDR1 transzkripciójának szabályozásában. David és kollégái drog-szenzitív MCF-7 és drog-rezisztens MCF-7/ADR mellrák sejtek vizsgálatával próbáltak közelebb jutni az MDR1 expresszióját befolyásoló epigenetikai faktorok pontos működési mechanizmusának megértéséhez [76]. Jelentős eltérés mutatkozott a sejtvonalak promóter régióinak metiláltsági mintázatában: a szenzitív sejtekben sokkal több metilált CpG dinukleotid jelenlétét igazolták. Kromatin immunoprecipitációs kísérletekkel a szenzitív sejtek promóter régióját egy represszív kromatin struktúrával jellemezték, minimális mennyiségű acetilált hiszton és YB-1 transzkripciós faktor, valamint jelentős mennyiségű MeCP2 fehérje jelenlétével. Ezzel szemben a rezisztens sejtek egy nyitottabb, aktív kromatin

struktúrát mutattak, jelentős mennyiségű acetilált hiszton és YB-1, valamint kis mennyiségű MeCP2 jelenlétével. Mivel a MeCP2 fehérjéről korábban kimutatták, hogy (többek között) hiszton deacetiláz fehérjével való kölcsönhatása révén segíti elő a represszív kromatin struktúra kialakulását [77], ezért a kutatók kíváncsiak voltak, hogy a hiszton deacetiláz gátló (HDACi) trichostatin A (TSA) hogyan befolyásolja a transzkripciót. Kiderült, hogy a promóter metiláltsági foka befolyásolja a TSA kezelés hatását: csak hipometilált promóter esetén aktiválta a génátírást. Hasonló megfigyelésről számolt be drog-szenzitív és drog-rezisztens T-sejtes leukémia sejtvonalak vizsgálata alapján El-Osta és munkacsoportja [78]. A drog-szenzitív sejtekben az ABCB1 promóterében található CpG dinukleotidok metilációja, a MeCP2 fehérjével és a hipoacetilált hisztonokkal együtt represszív kromatinszerkezetet alakít ki és gátolja az MDR1 kifejeződését. A TSA kezelés, bár a H3 és H4 fehérjék acetilációját jelentősen megnövelte, a transzkripciót nem aktiválta. A sejtek 5-azaC kezelése a DNS demetilációját, ezzel együtt a MeCP2 felszabadulását, a hiszton acetiláció kis fokú növekedését és az MDR1 transzkripciójának alacsony aktivitását eredményezte. A két szer együttes alkalmazása az ABCB1 expressziót jelentősen megnövelte. Ugyanakkor a hipometilált promóterrel rendelkező rezisztens sejtek MDR1 expresszióját a TSA kezelés jelentősen megnövelte, azonban az 5-azaC nem befolyásolta. A két szer kombinációja az expressziót a TSA kezelés hatására bekövetkezett szintre emelte. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a DNS metiláció és a hiszton acetiláció között hierarchikus viszony áll fenn. Amennyiben a promóter hipermetilált, a metiláció dominál a hiszton acetiláció fölött a represszált transzkripció fenntartásának érdekében. Ebben az esetben hiába emelkedik meg az acetilált hisztonok mennyisége, az nem elegendő a transzkripció aktivációjához. Amikor azonban a promóter valamilyen módon demetilálódik, a megemelkedett hiszton acetiláció immár elégséges a génátírás elindításához.

Mint ahogy a multidrog rezisztencia különböző aspektusainak vizsgálata során oly sokszor, ebben a kérdéskörben is előfordulnak egymásnak (látszólagosan) ellentmondó eredmények. Chen és kollégái 2012-ben publikált cikkükben egészséges, valamint rákos, drog-szenzitív és drog-rezisztens hasnyálmirigy sejteket vizsgáltak. Kimutatták, hogy az egészséges sejtekhez képest a drog-szenzitív rákos sejtek kb. 5x, míg a drog-rezisztens sejtek kb. 10x magasabb MDR1 expressziót mutattak. Amikor összehasonlították a sejtek MDR1 promótereinek metilációs mintázatait, nem találtak jelentős különbségeket, mindhárom promóterben alacsony fokú metilációt detektáltak. Ezen megfigyelés alapján feltételezték, hogy a hasnyálmirigy sejtekben a hiszton fehérjék acetilációja sokkal fontosabb szerepet

játszik az ABCB1 gén aktivitásában, mint a promóterének metilációja. Mivel a promóterek acetilációs mintázatát nem vizsgálták meg, ezért a feltételezésüket kísérletesen alátámasztani nem tudták [79].

1.5.2.4. A kemoterápia hatására bekövetkező epigenetikai változások

A rákos betegek kemoterápiás kezelése során gyakran előfordul, hogy a kezelésre kezdetben jól reagáló tumor a kemoterápiás szer hatására a P-gp túltermelése révén multidrog rezisztenssé válik. Baker és kollégái kemoterápiás szerek hatására bekövetkező epigenetikai változásokat, illetve azok MDR1 expresszióra gyakorolt hatásait vizsgálták [80]. Kimutatták, hogy a kemoterápiás szerek, noha az MDR1 expresszióját jelentősen megemelték, azt nem a promóter régió metilációs állapotának megváltoztatásával érték el. Az expresszió ily mértékű növekedése azonban csak olyan sejtekben volt megfigyelhető, ahol a promóter legalább részlegesen hipometilált állapotban volt. Továbbá azt is megállapították, hogy a kemoterápiás drogok hatására az acetilált H3 hisztonok feldúsultak a promóter régióban, amit később az MDR1 fokozott expressziója követett. Egyes sejtvonalakban a megemelkedett ABCB1 mRNS szint létrejöttében a transzkripció aktivációja mellett az mRNS megnövekedett stabilitása is szerepet játszott. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a kemoterápiás szerek hatására megjelenő MDR tumorok kialakulásában a korábban említett modellek kombinációja játszik fontos szerepet. Elsőként a heterogén tumorsejt populáció legalább részlegesen hipometilált ABCB1 promóterrel rendelkező sejtjeinek pozitív szelekciója megy végbe, majd ezen sejtekben az MDR1 promóterében létrejövő hiszton acetilációs változások hatására aktiválódik a génátírás. A keletkezett mRNS-ek stabilitásának megnövekedése tovább emeli az MDR1 fehérje szintjét.

1.5.3. Hiszton deacetiláz inhibitorok

A HAT és HDAC enzimek mennyiségében és/vagy aktivitásában bekövetkező változások a célfehérjék acetilációja és deacetilációja között lévő kényes egyensúly felbomlásához vezetnek. Mivel a hiszton fehérjék acetilációs állapota fontos szerepet tölt be a

génexpresszió szabályozásában, ez a felborult egyensúly számos betegség (mint például a rák) kialakulásában és előrehaladásában fontos szerepet játszhat. Ezt alátámasztandó, a mai napig sokféle ráktípusban mutatták ki a HDAC enzimek túlzott jelenlétét [81]. A rákos sejtek kialakulása során a megemelkedett HDAC szint hatására bizonyos gének, többek között tumor szupresszorok, pro-apoptotikus faktorok és sejtciklus-szabályozó gének promótere deacetilálódik, transzkripciójuk inaktíválódik. Ennek eredményeképp ezek a sejtek kikerülnek a sejtciklus szabályozása alól és ellenállnak az apoptotikus szignáloknak. A rák kialakulásában szerepet játszó olyan genetikai tényezőkkel szemben, mint például a delécio és mutáció, ez esetben a genetikai információ nem sérül. Az eltolódott hiszton acetilációs mintázatot a hiszton deacetiláz enzimek farmakológiai gátlásán keresztül próbálják meg helyreállítani. Ezek a gátlószerke az ún. hiszton deacetiláz inhibitorok (HDACi), melyeket kémiai tulajdonságaik alapján 4 csoportba oszthatunk: hidroxámsav-származékok, ciklikus peptidek, benzamidok és rövid láncú zsírsavak [82]. Közös tulajdonságuk, hogy mindannyian tartalmaznak egy cink-kötő csoportot, ezért a HDAC enzimek cink-függő I., II. és IV. családjának tagjait képesek gátolni, eltérő specificitással. A hidroxámsav-származékok, mint a trichostatin A és strukturális analógja, a SAHA mindhárom család összes tagjának működését képesek blokkolni (pán-specifikus inhibitorok).

1.5.3.1. A hiszton deacetiláz inhibitorok alkalmazása a rákterápiában

A hiszton deacetiláz inhibitorok képesek elpusztítani a rákos sejteket, ám ennek a folyamatnak a pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert. A kezelt sejtekben a HDAC enzimek gátlása miatt a hiszton és nem-hiszton fehérjék acetilációja megemelkedik. A hisztonok fokozott acetilációja a génexpresszió megváltozását eredményezi, míg a nem-hiszton fehérjék (transzkripciós faktorok, különböző citoplazmatikus fehérjék) acetilációja vagy indirekt módon befolyásolja a transzkripciót vagy direkt módon egyéb más sejtes folyamatokban okozhat változást. Röviden, a hiszton deacetiláz inhibitor kezelés hatására a rákos sejtekben többek között leállhat a sejtciklus, aktiválódhat az apoptózis extrinsic és intrinsic útvonala. Ezen kívül a HDACi-ok gátolják a tumorokban az angiogenezist és megakadályozzák az áttétképződést [83-85]. Fontos megjegyezni, hogy a rákos sejtek HDACi kezelésre adott válasza sok tényezőtől függ: befolyásolhatja a sejtípus, az alkalmazott inhibitor szerkezete, koncentrációja és a kezelés időtartama [86]. Használatukat még

vonzóbbá teszi az a tény, hogy a rákos sejtek sokkal nagyobb érzékenységet mutatnak a HDACi kezelésre, mint az egészséges társaik. A hiszton deacetiláz inhibitorok eme tumorszelektív hatásának pontos mechanizmusa- néhány esettől eltekintve- kevésbé ismert. Kimutatták, hogy a SAHA duplaszálú DNS-töréseket okoz mind az egészséges, mind a rákos sejtek genomjában, azonban ezeket a töréseket csak az egészséges sejtek képesek kijavítani [87]. Egy másik tanulmány szerint a HDAC inhibitorok a rákos sejtekben a pro-apoptotikus faktorok transzkripciójának fokozásán és a túlélést segítő gének kifejeződésének csökkentésén keresztül érték el a tumor sejtek szelektív pusztulását [88]. Ezen előnyös tulajdonságaik miatt a hiszton deacetiláz inhibitorok ígéretes rákellenes gyógyszerek, rendkívül intenzív kutatások folynak a rákterápiában való alkalmazásukkal kapcsolatban. Számos szer a klinikai tesztelés különböző fázisaiban jár, eddig az amerikai FDA ügynökség két HDAC inhibitort hagyott jóvá rákellenes gyógyszerként. Az egyik a SAHA, amit Vorinostat néven 2006 óta, a másik a depsipeptide, amit Romidepsin néven 2009 óta forgalmaznak, mindkettőt a cutan T-sejt lymphoma kezelésére alkalmazzák [89, 90]. Számos tanulmány támasztja alá, hogy a HDACi-ek más kemoterápiás szerekkel (topoizomeráz II-gátlók, DNS-metiláció inhibitorok, stb.) együtt alkalmazva nagyobb hatékonysággal pusztítják el a rákos sejteket [91, 92]. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a hiszton deacetiláz inhibitorok kombinációs terápiában való alkalmazása hatékony módszert biztosít a rák ellen folyó küzdelemben. Újabban a kombinációs terápia alkalmazása mellett hibrid hatóanyagok előállításával is próbálkoznak, erre példa a colchicine-SAHA hibrid molekula, mely egyszerre veszi célba a mikrotubulusokat és a hiszton deacetilázokat [93].

1.5.3.2. A hiszton deacetiláz inhibitorok hatása az ABCB1 expressziójára

Az intenzív kutatások során egyre több olyan eredmény is napvilágot látott, miszerint a HDAC inhibitorok a kezelt sejteket rezisztenssé tehetik más kemoterápiás szerekkel szemben. A rezisztencia kialakulásában elsősorban a P-gp fehérje megjelenésének van domináns szerepe, de más faktorok is közreműködhetnek benne [94]. Többek között a klinikumban alkalmazott Vorinostat-ról is kimutatták, hogy MDR1-független módon drog rezisztenciát okozott vastagbélrák sejtekben [95]. Mivel a rezisztencia kialakulásáért túlnyomó többségben az MDR1 fehérje megjelenése tehető felelőssé, valamint dolgozatom témája is ehhez kapcsolódik, ezért a továbbiakban erre a területre fókuszálok. Nem sokkal a P-gp felfedezése

után már kimutatták, hogy a HDACi Na-butirát kezelés aktiválja az ABCB1 expresszióját [96]. Ezután sorra jelentek meg az olyan tanulmányok, melyek a különböző hiszton deacetiláz inhibitorok MDR1 expressziójára gyakorolt hatását vizsgálták különböző, drog-szenzitív sejtekben: kimutatták, hogy a trichostatin A [74], a depsipeptide [97], az apicidin [98], a valproát [99] mindegyike megemelte az ABCB1 expresszióját, és ezáltal drog-rezisztenssé tette a kezelt sejteket. A HDAC inhibitorok hatására bekövetkezett MDR1 aktiváció pontos molekuláris mechanizmusát még nem sikerült teljesen feltárni. Kim és munkatársai kimutatták, hogy azokban a sejtvonalakban, melyekben a HDAC inhibitor kezelés hatására aktiválódott az ABCB1 gén, az ABCB1 promóter régiójában a HDAC1 hiszton deacetiláz levált a kromatinról, és ezzel párhuzamosan a PCAF hiszton acetyl-transferáz és a C/EBP β koaktivátor odakötődött. Emellett megemelkedett a H3 acetyláció és a H3K4 metiláció szintje, valamint az RNS polimeráz II is nagyobb mértékben kötődött a promóterhez. Ezek a változások azonban nem következtek be a kezelésre nem reagáló sejtvonalakban. További érdekes különbség volt a sejtvonalak között, hogy a HDAC inhibitor hatására aktiválódott a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) jelátviteli út, de csak az ABCB1 indukciót mutató sejtekben. Amennyiben a foszfatidil-inozitol-3-kináz út vonalat gátolták, az ABCB1 expressziója lecsökkent. A HDAC inhibitor az Sp1 transzkripciós faktor PI3K általi foszforilációját indukálta. A foszforilált Sp1 ezután a HDAC1 promóterről való leválását és a PCAF valamint az RNS polimeráz II bekötődését idézte elő. Tehát a HDAC inhibitor hatásához egy szignál transzdukciós út aktivációjára is szükség volt, ami arra utal, hogy a transzkripció aktivációja több ponton is szabályozott, és hiszton acetylációs szint fenntartása önmagában nem elégséges a génkifejeződés fokozásához [100]. Xu és kollégái egy 2012-ben megjelent tanulmányukban leírták, hogy szenzitív colorectális sejtekben HDACi kezelés hatására megnövekedett az MDR1 fehérje mennyisége, és ennek köszönhetően a sejtek rezisztenciát mutattak számos kemoterápiás szerrel szemben. Kimutatták, hogy a HDACi gátolja a HDAC1 és HDAC2 enzimek működését, ennek hatására az SP1 transzkripciós faktor acetylálódik és elősegíti a p300/PCAF/NF-Y komplex bekötődését az ABCB1 promóteréhez. Ezután a promóter régióban a H3 acetyláció megemelkedik, és fokozódik a génátírás [101]. A hiszton deacetiláz inhibitorok nemcsak szenzitív, hanem rezisztens sejtekben is hatással vannak az MDR1 expressziójára. Kimutatták, hogy drog-rezisztens sejtekben a HDACi-ok tovább emelték az MDR1 expresszióját [78, 97]. Meglepő módon a szakirodalomban arra is találunk példát, hogy a HDACi kezelés vagy nem befolyásolta [102], vagy egyenesen csökkentette a rezisztens sejtek MDR1 expresszióját. Daunomycin-rezisztens egér leukémia sejtekben TSA és SAHA kezelés hatására csökkent a sejtek MDR1 expressziója [103]. El-

Khoury és kollégái humán kissejtes tüdőkarcinóma sejtek drog-szenzitív, P-gp-negatív (H69WT) és rezisztens, P-gp-pozitív (H69VP) változataiban vizsgálták a TSA és a Na-butírat MDR1 kifejeződésére gyakorolt hatását [104]. A kezelés után az ABCB1 expressziója a szenzitív sejtekben jelentősen megemelkedett, ezzel ellentétben a rezisztens sejtekben drasztikusan lecsökkent. Az inhibitorok hatása a DNS metilációjától függetlenül következett be, hiszen a promóter régiók mindkét sejtvonalban azonos, alacsony metilációs szintet mutattak. Mivel az MDR1 génexpresszió szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszó két epigenetikai faktor közül a DNS-metilációban nem tapasztaltak különbséget, ezért figyelmük a hiszton fehérjék acetilációja felé fordult. Kimutatták, hogy a TSA kezelés hatására mindkét sejtvonalban megemelkedett a globális H3ac és H4ac szintje. Az ABCB1 promóter régióját vizsgálva megállapították, hogy a szenzitív sejtekben az acetilált H3 mennyisége a HDACi kezelést követően az idő múlásával egyre jobban emelkedett, a rezisztens sejtekben viszont ez az emelkedés hamarabb lecsengett, és megközelítőleg visszatért a kiindulási értékhez. Azt, hogy ennek van-e szerepe MDR1 expresszió csökkenésében, és ha igen, akkor pontosan milyen, nem sikerült megmagyarázni. Az acetilált H4 mennyisége mindkét sejtvonalban folyamatosan emelkedett. A TSA kezelés hatására a HAT aktivitással rendelkező PCAF fehérje kötődése az ABCB1 promóteréhez hasonló mértékben megnövekedett mindkét sejtvonalban. A szenzitív sejtek esetében ez a megfigyelés alátámasztja a PCAF korábban bemutatott aktiváló szerepét az MDR1 expressziójában. A rezisztens sejtekben azonban a PCAF fokozott jelenléte ellenére az MDR1 expressziója lecsökkent, ami arra utal, hogy ezekben a sejtekben a génexpresszió csendesítése független a PCAF kötődésétől.

A fentiek alapján elmondható, hogy a HDAC inhibitorok különbözőképp befolyásolhatják az MDR1 expresszióját, ennek pontos magyarázata azonban még várat magára. Az eddigi eredmények alapján valószínűsítik, hogy a HDACi-ok sejtvonal-specifikus módon fejtik ki hatásukat az ABCB1 transzkripciójára. Mivel ezek a szerek ígéretes rákellenes hatásuk miatt potenciális gyógyszerjelöltek, a klinikumba való bevezetésük előtt körültekintő és alapos vizsgálatuk- különös tekintettel a multidrog rezisztencia kialakulásában betöltött esetleges szerepükre- elengedhetetlen.

1.6. *Abcb1* gének a rágcslókban

Mivel munkám során patkány hepatoma sejtvonalakkal dolgoztam, ezért fontos megjegyezni, hogy az embertől eltérően a rágcslókban az *Abcb1* génnek két homológia létezik: az *Abcb1a* és az *Abcb1b* [105]. Szekvencia-elemzések alapján az ABCB1a közelebbi rokona a humán ABCB1 fehérjének, valamint az *Abcb1a* promóter régiója is nagyfokú hasonlóságot mutat a humán ABCB1 gén promóterével [105, 106]. Az *Abcb1a* génről egy 4927 bp hosszúságú, míg az *Abcb1b* génről egy 3888 bp hosszúságú mRNS képződik, melyek egymáshoz viszonyítva 88%-os homológiát mutatnak. Az ABCB1a fehérje 1272 aminosav hosszúságú, az ABCB1b fehérje 1275 aminosavból áll. Ezek a fehérjék egymással 84%-os homológiát mutatnak (1. függelék). A rágcslók ABCB1 fehérjéi szövetspecifitásokat tekintve különböznek egymástól, az ABCB1a a vér-agy gát és az emésztő szervrendszer epitél sejteinek felszínén, míg az ABCB1b a petefészekben és terhesség alatt a méhben expresszálódik [107].

A rágcslókban megtalálható ABCB1 homológok kiváló lehetőséget biztosítanak a kutatók számára az MDR fenotípus kialakulásának molekuláris hátterének vizsgálatára, így közelebb juttatva őket a jelenség pontos megértéséhez és esetleges megelőzéséhez/gyógyításához.

Dolgozatomban multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtvonalakat használtam a MDR fenotípus kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok, különös tekintettel a hiszton acetiláció szerepének a felderítésére. A közepesen (col500) és az erősen (col1000) multidrog rezisztens sejtvonalakat a dexametazon-rezisztens anyai sejtvonal (D12) növekvő koncentrációjú kolhicinnel való kezelése során szelektálták. Az így létrejött col500 és col1000 sejtek keresztrezisztenciát mutattak számos, szerkezetileg különböző droggal szemben. Kimutatták, hogy az anyai sejtvonalhoz képest jelentősen megemelkedett bennük az MDR1 mRNS és fehérje szintje, valamint leírták, hogy a jelenség hátterében nem génamplifikáció áll [108, 109].

A fentiek alapján ezek a sejtek ideális választásnak tűntek az ABCB1 gének túltermelésében fontos szerepet játszó mechanizmusok, ezek közül is megkülönböztetett figyelemmel a hiszton acetilációs változások tanulmányozására.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célul tűztem ki a multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtekben megfigyelt megemelkedett ABCB1 expresszió háttérében álló mechanizmusok, különös tekintettel a hiszton acetiláció szerepének a feltérképezését. Ennek érdekében a következő kérdésekre kerestem választ:

1. Az MDR fenotípus kialakulásában az ABCB1a és/vagy az ABCB1b transzporterek megemelkedett aktivitása játszik-e fontos szerepet? Esetleg az ABCC1-nek is szerepe van benne?
2. Az ABCB1 megnövekedett aktivitásában szerepet játszik-e
 - az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének amplifikációja,
 - az *Abcb1a* és *Abcb1b* génekről képződött mRNS-ek stabilitásának megváltozása,
 - az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének transzkripciójának megváltozása?
3. Megfigyelhető-e az *Abcb1* gének transzkripciójának olyan változása, ami összefüggésben áll a kromatin szerkezetét befolyásoló hiszton módosítások változásával?
4. A hisztonok acetilációját befolyásoló szerek (hiszton deacetiláz gátlók) hatással vannak-e az *Abcb1* gének expressziójára?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejtek tenyésztése

A kísérleteim során használt patkány hepatoma sejtvonalak Dr. Venetianer Anikó laboratóriumából származnak [108, 109]. A sejteket 75 cm²-es flaskában (Orange Scientific) tartottam fenn 5 % magzati borjú szérummal (FBS, Lonza), 0.01 % streptomycinnel, 0.005 % ampicillinnel (Sigma) és 1mM L-glutaminnal kiegészített Ham's F12 (Lonza) tápfolyadékban. A multidrog rezisztens col500 és col1000 sejtek tápfolyadékát 500 illetve 1000 ng/ml kolhicinnel (Sigma) egészítettem ki. A sejtvonalakat 37 °C-on, párás környezetben, 5 % CO₂-ot tartalmazó inkubátorban növesztettem, a tápfolyadékot kétnaponta cseréltem. Amikor a sejtek teljesen benőtték a tenyésztőedény felületét, a tápoldat eltávolítása után kétszer mostam a sejteket 1-1 ml 1x PBS oldattal [foszfáttal pufferolt sóoldat (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl pH = 7,4)] majd 1 ml 1x tripszin (Sigma) alkalmazásával elválasztottam őket az edény falától. A felfuszpendált sejtek kétharmadát eltávolítottam, a maradékot pedig 12 ml tápoldattal kiegészítve visszamértem a flaskába.

A kísérletek előtt a drog-rezisztens col500 és col1000 sejtek 3 napig kolhicin-mentes komplett tápfolyadékban nőttek.

A kísérletek során a hiszton-deacetiláz gátló (HDACi) trichostatin A (TSA) 50 ng/ml koncentrációban került hozzáadásra 6 órán keresztül.

3.2. Multidrog-transzporterek aktivitásának meghatározása

Az élő sejtek ABCB1 és ABCC1 pumpa-aktivitásának kvantitatív meghatározásához SOLVO MultiDrugQuant™ Assay (MDQ) kit-et használtam [110], a kísérleteket a SOLVO Zrt. laboratóriumában végeztem el.

A 6 órás TSA kezelés után a sejteket 1x PBS-ben mostam, majd a tápfolyadékot eltávolítottam és tovább inkubáltam őket komplett F12 tápoldatban 4 órán keresztül. Az

inkubációs idő lejártá után a sejteket összegyűjtöttem, és a kit-ben leírt protokollt követve előkészítettem őket az aktivitás-méréshez. A minták fluoreszcencia-intenzitásának mértékét áramlási citométer (Partec CyFlow space) segítségével határoztam meg (488 nm excitációs lézer, 512-542 nm detektor, 10 000 sejt/minta). A calcein multidrog rezisztencia aktivitás faktort (MAF_C) a következő egyenlettel számítottam ki: $MAF_C = 100 \times (F_{Max} - F_0) / F_{Max}$, ahol F_{Max} az ABCB1 és ABCC1 inhibitor Verapamil-lal kezelt minta maximális fluoreszcencia értéke, F_0 pedig az oldószeres kontroll fluoreszcencia értéke. Az ABCC1 pumpa multidrog rezisztencia aktivitás faktora (MAF_{ABCC1}) az alábbi egyenlettel határozható meg: $MAF_{ABCC1} = 100 \times (F_{ABCC1} - F_0) / F_{Max}$, melyben F_{ABCC1} az ABCC1 inhibitor Indomethacin-nal kezelt minta fluoreszcencia értéke. A fenti értékekből könnyedén kiszámítható az ABCB1 pumpa MAF-a: $MAF_{ABCB1} = MAF_C - MAF_{ABCC1}$.

A MAF értékek elméletileg 0 és 100 közötti skálán mozognak.

3.3. Össz RNS-izolálás és egyes szálú cDNS-szintézis

A sejtekből RNeasy Plus Mini Kit-et (QIAGEN) használva össz RNS-t preparáltam a kit-hez tartozó protokollt követve. Az így elkészített RNS-minták koncentrációját NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) segítségével határoztam meg. Ezután 2 µg össz RNS-t írtam át egyes szálú cDNS-sé random hexamer primerek segítségével, TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) felhasználásával, követve a gyártó útmutatásait. A reverz transzkripció az alábbi reakciókörülmények mellett játszódott le: 25 °C 10 perc, 37 °C 60 perc, 95 °C 5 perc.

3.4. Génexpresszió meghatározása kvantitatív valós idejű PCR (QPCR) módszerrel

A vizsgálni kívánt génekre specifikus primerpárokat terveztem primer 3 és Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programok segítségével. A primerek szekvenciáit az 1. táblázatban tüntettem fel. Első lépésben az elkészült primerek felhasználásával optimalizáltam azok koncentrációját a QPCR reakcióhoz. A kvantitatív valós idejű PCR reakciókat ABI 7500

Real Time System (Applied Biosystems) típusú készülékben futtattam le. A reakcióban keletkező termékeket SYBR Green interkalálódó festéket tartalmazó Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) reagens felhasználásával detektáltam. A PCR reakciókörülményei a következők voltak: 95 °C 10 perc, 95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc (az utolsó két lépés 40 cikluson keresztül ismétlődött). A relatív mRNS szintek meghatározásához a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert (Livak és Schmittgen, 2001) alkalmaztam. A vizsgált gének kifejeződését minden esetben 18S riboszómális RNS bemérési (endogén) kontroll expressziójához viszonyítottam.

Primer név	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
rat <i>Abcb1a</i>	ACCAGCGGTCACTGTGCT	CGGTTGTTTCCTACATTTGC
rat <i>Abcb1b</i>	GTTGGCATATTCGGGATGTT	TCGCTGACGGTCTGTGTACT
rat pre-<i>Abcb1a</i>	CCATGGAATTGCGCTCCCAC	GGACAGCCTCCACTACATAGACCA
rat pre-<i>Abcb1b</i>	TTCGGGATGGTGAGTTTGGGA	GGAAGCTCAGTACAGGGCAAAT
rat <i>Abcb1a</i> 3. intron	CTTGCCCCACACTCTCATCT	TGAGACACTGGCTTTTCTGG
rat <i>Abcb1a</i> end	GGGATCTGTAGGAAGAGGGG	TCAAGTCTGCGTTCTGGATG
rat <i>Abcb1b</i> 3. intron	ACTCCCTGCTCTGCATGTCT	AAAGGGTCTCTGGGTCAGGT
rat <i>Abcb1b</i> end	GGTTATGGAGGGGGATCTGT	TCAAGTCTGCGTTCTGGATG
rat <i>Abcb1a</i> inic	GCCCAGGCACAGTCGAACA	TCCTCCGTAAGGTCCGCCAA
rat <i>Abcb1a</i> -1500	CGCTCCTCATCAACCCATCCC	ACCCAGGACTTCTTCGGCAC
rat <i>Abcb1b</i> inic	TCCTTGCCCAATTCCACCCAC	CAGCGGCCTCAGCCTCTTAC
rat <i>Abcb1b</i> -1500	TGTTTCTATGCCGCCCAAATCCA	GCAAGGCCCAACCCTTTCT

1. táblázat. A kvantitatív valós idejű PCR (QPCR) vizsgálatokban használt primerek szekvenciái

3.5. Genomi DNS izolálás

A D12, col500 és col1000 sejteket összegyűjtöttem, kétszer mostam 1x PBS oldattal, majd felfuszpendáltam őket lízis pufferben (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 2% SDS) és 5 percig 65 °C-on inkubáltam. Az inkubációs idő letelte után 4.5 M-os NaCl oldatot mértem az elegyhez, óvatosan összekevertem, majd centrifugálással (13 000 rpm, 5 perc) a kicsapódott fehérjéket és sejtörmeléket kiülepítettem, ezután a DNS-t tartalmazó felülúszót tiszta Eppendorf csőbe mértem. A genomi DNS-t izopropanol segítségével kicsaptam, ezt követően újbóli centrifugálással (13 000 rpm, 5 perc) ülepítettem. A csapadékot 70 %-os etanollal mostam, levegőn szárítottam majd 10 mM Tris-HCl (pH = 8.0) pufferben visszaoldottam a DNS-t. A preparátum minőségét és koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel határoztam meg.

3.6. RNS stabilitás meghatározása

A kísérlet előtti napon 6-lyukú edényekbe 2.5×10^5 sejtet osztottam ki. Másnap a sejteket 20 µg/ml koncentrációjú actinomycin D-vel (Sigma) kezeltem, majd a kezelést követően az egyes mintákról 6, 12, 24 és 36 óra elteltével a tápfolyadékot eltávolítottam, a sejteket kétszer mostam jég hideg 1x PBS-oldattal, majd összegyűjtöttem őket. A sejtekből totál RNS-t izoláltam, cDNS-t szintetizáltam (lásd 3.3 bekezdés) és a relatív mRNS mennyiségeket QPCR technikával határoztam meg (lásd 3.4. bekezdés).

3.7. A szabályozó régiók szekvenciájának meghatározása

D12, col500 és col1000 sejtekből izolált genomi DNS templátokon PCR reakciókat végeztem az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének szabályozó régióinak felsokszorozásának érdekében, specifikus primerpárok segítségével [rat *Abcb1a* prom forward (5'-CCAAAAGGAAGGCAAGAACA-3'), rat *Abcb1a* prom reverz (5'-CTTTCCGATTTCTCCGTAA-3'); rat *Abcb1b* prom forward (5'-

TTGCCTCTGTCCCTTCTGTT-3'), rat *Abcb1b* prom reverz (5'-GAAGTCCGCCAAGATGTAGAA-3')]. A PCR reakciót Bio-Rad MyCycler (Bio-Rad) készüléken végeztem, az alábbi reakciókörülményeket használva:

95 °C 10 perc

95 °C 45 másodperc, 60 °C 30 másodperc, 72 °C 4 perc, 40 ciklus

72 °C 10 perc

Az így kapott termékeket pJET 1.2 (Fermentas) klónozó plazmidokba építettem. A szekvenálást a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjában található Szekvenáló laboratóriumában kapilláris szekvenátor segítségével végezték. A szekvenáló primereket a CloneJet PCR Cloning Kit (Fermentas) tartalmazta. A pJET1.2 plazmidhoz javasolt forward és reverse primereket is felhasználtam.

pJET1.2 forward sequencing primer: 5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3'

pJET1.2 reverse sequencing primer: 5'AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 3'

3.8. Az *Abcb1* génnek szabályozó régióinak beépítése luciferáz riporter gént tartalmazó plazmidba

A D12 sejtekből származó *Abcb1a* és *Abcb1b* szabályozó régiókat tartalmazó pJET1.2 plazmidokból a szekvenciákat restrikciós endonukleáz enzimek segítségével luciferáz riporter gént tartalmazó pGL3-basic plazmidba (Promega) építettem (pGL3-*Abcb1a*-Luc és pGL3-*Abcb1b*-Luc).

3.9. Riporter plazmidok tranziens transzfekciója és luciferáz aktivitás mérés

A transzfekció előtti napon 6-lyukú edényekbe 2.5×10^5 sejtet osztottam ki. A transzfekció során pGL3-*Abcb1a*-Luc és pGL3-*Abcb1b*-Luc riporter plazmidokat (4-4 µg) D12, col500 és col1000 sejtekbe juttattam TurboFect (Fermentas) reagens felhasználásával,

követve a gyártó utasításait. Az inkubációs idő (24 óra) letelte után a tápoldatot eltávolítottam, majd a sejteket kétszer mostam jéghideg 1x PBS oldattal. A sejteket ezután összegyűjtöttem, 1x lízis pufferben (Promega, Cell Culture lysis Reagent 5x) fel-le pipetázással felszuszpendátam, majd 30 perig jégen inkubáltam. Ezután a mintákat centrifugálással (13 000 rpm, 4 °C, 5 perc) üleptettem, a felülúszókat tiszta Eppendorf csövekbe mértem, fehérje tartalmuk meghatározását Bradford-módszerrel elvégeztem [111]. A minták luciferáz aktivitását Orion L Microplate Luminometer-en (Berthold Detection System, Simplicity 4.2 software) mértem meg Promega luciferase assay kit (Promega) használatával, a gyártó utasításai szerint.

A transzfekció hatékonyságának meghatározásához zöld fluoreszcens fehérjét termelő pEGFP-N3 (Clontech) plazmidot ko-transzfectáltam a sejtekbe, majd a GFP-pozitív sejtek számát FACS analízissel (FACSCalibur, FL-1 filter) határoztam meg.

A mért luciferáz aktivitás értékeket a minták fehérje mennyiségével és a transzfekciós hatékonysággal korrigáltam.

3.10. Western blot

Az összegyűjtött sejteket 2x Laemmli SDS mintafelvívő pufferben (0,125 M Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 21 % glicerin, 2 mg brómfenolkék, 10 % 2-merkaptotanol) tártam fel a következő módszerrel: 10 perig forraltam a mintákat, közben 2 percenként vortexeléssel homogenizáltam. Egyenlő mennyiségű fehérje mintákat [Coomassie brilliant blue-festéssel (20 % Coomassie brilliant blue R250, 45 % etanol, 10 % ecetsav) meghatározva] futtattam meg 10 illetve 15 %-os SDS poliakrilamid gélen, majd átvittem (200 mA, 2 óra) nitrocellulóz membránra (Millipore). A transzfer eredményességét 0.1 % Ponceau-oldattal (Sigma) való festéssel ellenőriztem, majd desztillált vízzel addig mostam a membránt, míg az összes festék eltűnt. Ezután a membránt 5 % sovány tejport tartalmazó TBS-T (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20 pH 7.4) oldatban blokkoltam szobahőmérsékleten rázatva 1 órán keresztül. Ezután az elsődleges ellenanyagot 1 % BSA-t (Bovine Serum Albumin, Sigma) tartalmazó TBS-T-ben hígítottam, majd a membránt ebben az oldatban inkubáltam egy éjszakán keresztül rázatva 4 °C-on. Másnap szobahőmérsékleten 4x10 perig mostam a membránt TBS-T-vel. A torna-peroxidázzal kapcsolt anti-nyúl másodlagos ellenanyagot

szintén 1 % BSA-t tartalmazó TBS-T oldatban hígítottam, és 1,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam a membránt, majd ezt követően ismét 4x10 percig mostam TBS-T oldattal. A létrejött immunkomplexet kemilumineszcens detekciós módszerrel (ECL, Amersham Biosciences) röntgen filmen tettem láthatóvá.

A kísérletek során használt elsődleges ellenanyagok és hígításuk: anti-acetilált hiszton H4 (Serotec, AHP418) 1:1000 hígítás, anti-hiszton H3 (Abcam, ab1791) 1:1000 hígítás, anti-ABCB1a (Merck Millipore, AB10340), anti-ABCB1b (Merck Millipore, AB10337) és anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich, T9026) 1:5000 hígítás.

A kísérletek során használt másodlagos ellenanyagok és hígításuk: anti-nyúl (DAKO, P0448) 1:2000 hígítás az anti-acetilált hiszton H4 esetén, valamint 1:20000 hígítás anti-hiszton H3, anti-ABCB1a és anti-ABCB1b esetén; anti-egér (DAKO, P0260) 1:20000 hígítás anti- α -tubulin esetén.

3.11. Kromatin immunoprecipitáció (ChIP)

2 nappal a kísérlet előtt 5×10^6 db sejtet osztottam 10 cm-es Petri csészékbe. A harmadik napon 1 % formaldehid oldat hozzáadásával keresztkötöttem a sejtek tartalmát (7 perc, 4 °C-on rázatva), majd a keresztkötési reakciót 125 mM glicin hozzáadásával állítottam le, miközben a mintákat végig jégen tartottam. Ezután a sejteket kétszer mostam jéghideg 1x PBS oldattal, felkapartam majd centrifugálással összegyűjtöttem őket. A sejteket lízis puffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500x proteáz inhibitor koktél, 10 mM Na-butirát) hozzáadásával tartam fel 30 percig jégen tartva az elegyet. Ezután a keresztkötött kromatint hozzávetőlegesen 200-500 bp hosszúságú darabokra tördeltem Bioruptor szonikátor segítségével (Diagenode; 5 perces intervallum, 30 másodperc szonikálás/ 30 másodperc szünet), a mintákat végig jéghideg vízben tartva. Ezután 100 μ l szonikált sejt-lizátumhoz 900 μ l immunoprecipitációs puffert (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 % Triton X-100, 500x proteáz inhibitor koktél, 10 mM Na-butirát) adtam. Következő lépésben a mintákat 20 μ l 50% (1 μ g/ μ l hering sperma DNS-sel és 3 μ g/ μ l BSA-val blokkolt) protein G Sepharose gyöngy szuszpenzióval (Sigma) 3 órán keresztül 4 °C-on forgatva előtisztítottam. Az immunoprecipitációt 2 μ l anti-hiszton H3 (Abcam, ab1791), anti-hiszton H3K9ac (Abcam, ab4441) vagy anti-hiszton H3K14ac (Upstate, 07-353) ellenanyagokkal végeztem egy

éjszakán keresztül forgatva a mintákat 4 °C-on. Másnap a mintákhoz 20 µl 50 % protein G Sepharose gyöngy szuszpenziót mértem és 3 órán keresztül 4 °C-on forgattam őket. Ezt követően a protein G Sepharose-hoz kötött immunkomplexeket centrifugálással (2000 rpm, 4 °C, 5 perc) ülepittem és a felülúszókat eltávolítottam. Az ellenanyag nélküli kontroll mintából (NAC: no antibody control) 100 µl-t megőriztem, és később ezt használtam teljes bemérési kontrollként (TIC: total input control). A kicsapott immunkomplexeket háromszor mostam IP-puffer 1-gyel (0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), kétszer IP-puffer 2-vel (0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) és végül háromszor IP-puffer 3-mal (2 mM EDTA pH 8.0, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 % glicerin). A DNS-fehérje keresztkötéseket egy éjszakán át tartó 65 °C-on történt inkubálással oldottam fel. Ezután a fehérjék hidrolízisét végeztem el, 20 µg proteináz-K segítségével, 0.5 % SDS jelenlétében 3 órán keresztül 37 °C-os hőmérsékleten. A DNS-t fenol:kloroform:izoamil-alkohol-os (25:24:1) extrakcióval nyertem ki, majd alkohollal kicsaptam. A kicsapódott DNS-t 50 µl Tris-HCl (pH 8.0) oldatban feloldottam és QPCR-rel analizáltam (lásd 3.4. bekezdés).

3.12. Statisztikai analízis

Az ábrákon minimum 3, egymástól független mérés átlagának értékeit tüntettem fel, a szórásokkal együtt. Az eredmények statisztikai analízisét SPSS for Windows version 15.0. program felhasználásával végeztem el, a Mann-Whitney nem-parametrikus tesztet alkalmazva. Statisztikailag szignifikánsnak azt az eredményt vettem, melynek p értéke kisebb mint 0.05 ($p < 0.05$).

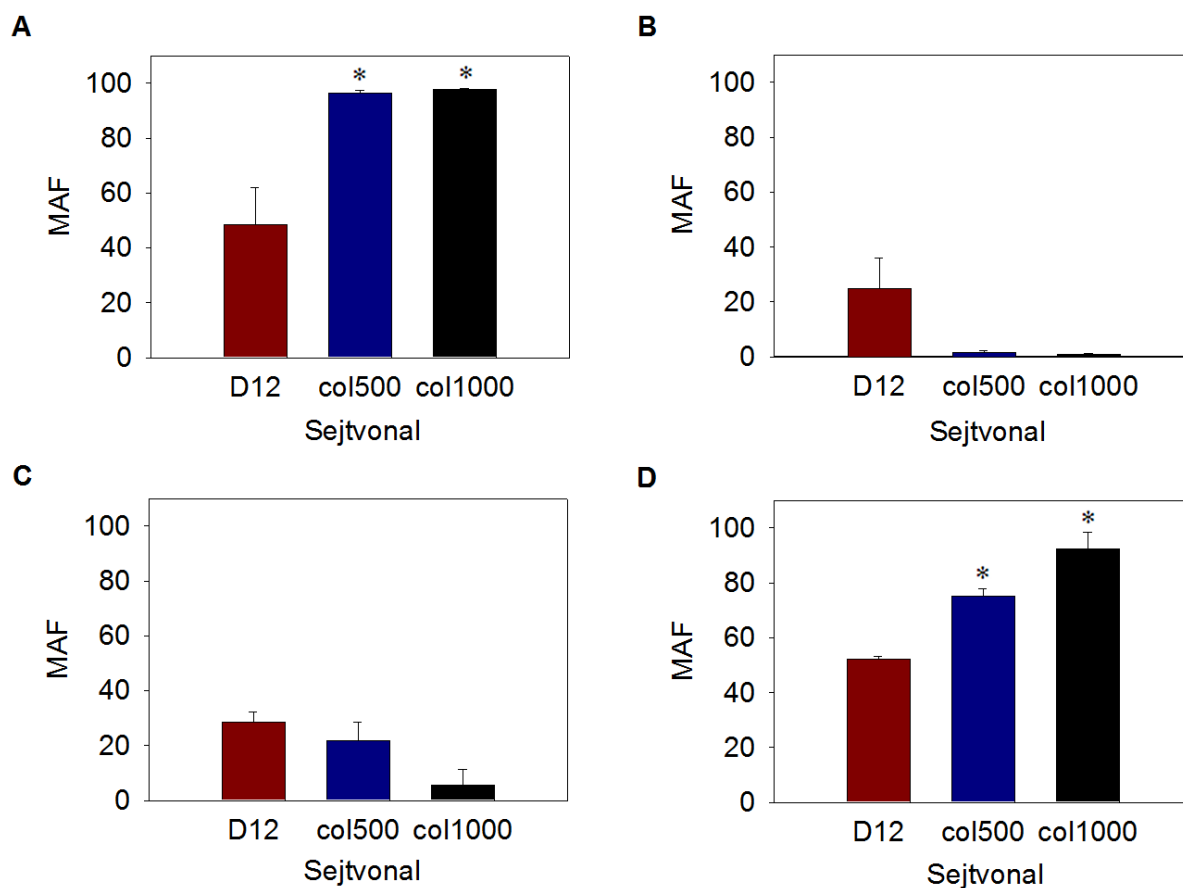
4. EREDMÉNYEK

4.1. A multidrog rezisztens sejtek megnövekedett ABCB1 és csökkent ABCC1 transzporter aktivitást mutatnak

A kísérleteim során használt multidrog rezisztens col500 és col1000 sejtvonalakat növekvő koncentrációjú kolhicin kezelés segítségével szelektálták [108, 109], ami mind az ABCB1, mind az ABCC1 transzporter szubsztrátja [112]. A sejtvonalak előállítását követően a rezisztens sejtekben megemelkedett ABCB1 fehérjeszintet és magasabb drog-efflux aktivitást detektáltak, mint a drog-szenzitív D12 anyasejtekben. Azonban arra vonatkozóan, hogy a multidrog-rezisztencia létrehozásában az ABCB1 transzporterek melyik izoformája játszik szerepet, illetve abban más pumpák aktivitásának megváltozása közreműködött-e, nem történtek további vizsgálatok. Ennek tisztázására a Solvo Zrt. MultiDrugQuant Assay Kit-jét felhasználva első lépésben meghatároztam a sejtvonalak ABCB1 és ABCC1 pumpa-aktivitás értékeit. A kit calcein-AM-et (calcein-acetoxymethyl ester), mint szubsztrát molekulát, Indomethacint, mint ABCC1 specifikus gátlószert, valamint Verapamilt, mint ABCB1 és ABCC1 gátlószert tartalmaz. A calcein-AM egy nem-fluoreszcens hidrofób molekula, mely képes a sejtmembránon áthatolva bejutni a citoplazmába, ahol specifikus észterázok gyorsan hidrolizálják. Ennek eredményeként létrejön egy fluoreszcens termék, a calcein, mely hidrofíl tulajdonságának köszönhetően a citoplazmában marad. Mivel a calcein-AM kiváló szubsztrátja mind az ABCB1, mind az ABCC1 pumpának, ezért ezek aktivitása a sejten belül alacsonyabb fluoreszcens calcein szintet eredményez. Ha a sejteket a szelektív gátlószerekkel kezeljük, a kezelt és kezeletlen mintákban mért fluoreszcencia-értékek különbségeiből meghatározható az adott pumpa aktivitásának értéke (multidrog rezisztencia aktivitási faktor, MAF) [113].

Mint arra a rendelkezésre álló információk alapján számítani lehetett, az ABCB1 transzporter aktivitása lényegesen magasabb értéket mutatott a multidrog rezisztens sejtekben, mint a szenzitív D12-ben (4.A ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy ezek az értékek megközelítik az elméletileg mérhető legmagasabb aktivitás értéket. Az ABCC1 pumpa vizsgálata viszont meglepő eredményt mutatott: a drog-érzékeny és a drog-rezisztens sejtek

között hozzávetőlegesen hússzor magasabb aktivitás értéket mértem a szenzitív sejtek javára (4.B ábra).



4. Ábra A rezisztens sejtek MDR fenotípusát az ABCB1b pumpa megemelkedett aktivitása okozza. MultiDrugQuant Assay Kit segítségével megállapítottam a sejtvonalak transzporter fehérjéinek aktivitás értékeit. **(A)** ABCB1 aktivitás, **(B)** ABCC1 aktivitás, **(C)** ABCB1a aktivitás, **(D)** ABCB1b aktivitás. * $p < 0.05$

Mivel ráegcsálókban az ABCB1 fehérjének két izoformája (ABCB1a és ABCB1b) van jelen, és a korábbi vizsgálatok nem tértek ki ezek aktivitásának elkülönítésére, ezért kíváncsi voltam arra, hogy vajon kimutatható-e valamilyen különbség a két izoforma aktivitása között a sejtvonalakban. A mérésekhez használt kit azonban önmagában nem alkalmas a két izoforma aktivitásának elkülönítésére, ezért azt az ABCB1b-specifikus gátlószer vinblastin [114] hozzáadásával kiegészítettem és így végeztem el a méréseket. A kapott eredmények azt

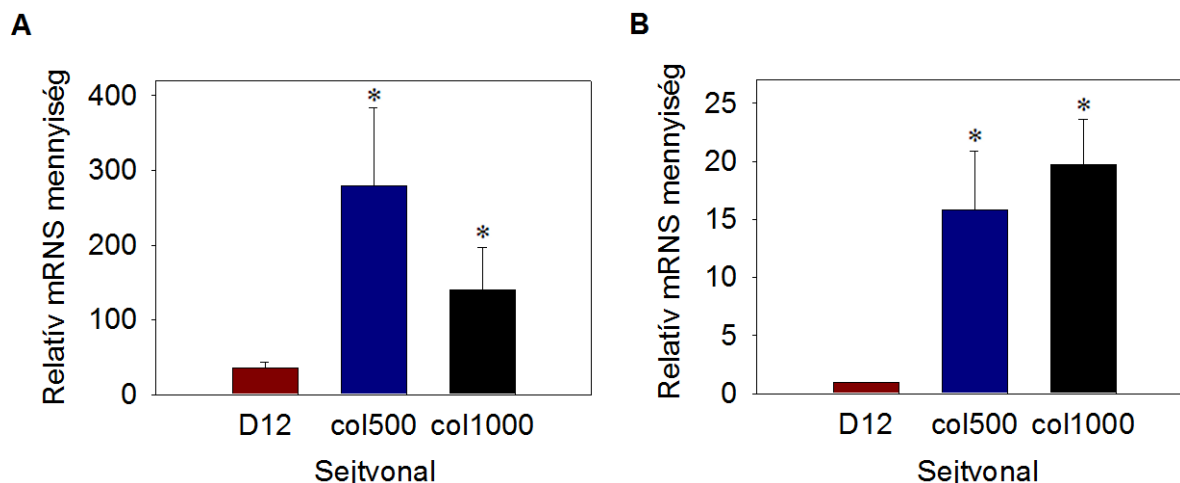
mutatják, hogy már a szenzitív sejtekben jelentős különbség van a két izoforma aktivitásában, ugyanis az ABCB1a esetén mért érték kb. fele az ABCB1b esetén detektáltak (4.C. és 4.D. ábra, első oszlop). A rezisztens sejtekben az amúgy is alacsonyabb ABCB1a aktivitás tovább csökken, col500 sejtek esetén kb. 25 %-kal, col1000 sejtek esetén kb. 80 %-kal (4.C ábra, második és harmadik oszlop). Ezzel ellentétben a magasabb ABCB1b aktivitás még tovább nő a rezisztens sejtekben, számszerűleg kb. 43 %-kal a col500 és kb. 77 %-kal a col1000 sejtvonalban (4.D ábra, második és harmadik oszlop).

Az eredmények alapján elmondható, hogy az általam vizsgált drog-rezisztens sejtek MDR fenotípusáért elsősorban az ABCB1b transzporter megnövekedett aktivitása felelős.

4.2. A rezisztens sejtekben megemelkedett az *Abcb1a* és az *Abcb1b* mRNS szintje

Ahogy azt az előző kísérletek eredményei bizonyítják, a drog-rezisztens sejtek megemelkedett efflux aktivitásában és a MDR fenotípus kialakításában az ABCB1 transzporterek kulcsszerepet játszanak. Felmerült a kérdés, hogy vajon az őket kódoló gének expressziójában történt-e valamilyen változás, ami elősegíti ezt a folyamatot. A kérdés megválaszolásához D12, col500 és col1000 sejtekből össz RNS-t izoláltam, reverz transzkripció kapcsolt PCR segítségével egyes szálú cDNS-t szintetizáltam, majd kvantitatív valós idejű PCR (QPCR) technika felhasználásával megmértem az *Abcb1a* és *Abcb1b* mRNS-ek mennyiségét.

Szembetűnő különbséget tapasztaltam a D12 sejtek *Abcb1a* és *Abcb1b* mRNS szintje között: az előbbi közel harmincszor magasabb értéket mutatott (5.A és B ábra, 1. oszlop). A drog-rezisztens col500 és col1000 sejtekben mindkét gén expressziója fokozódott a szenzitív sejtek expressziójához képest (5.A és B ábra, 2. és 3. oszlop). Érdekes megfigyelni azt a tényt, hogy bár az *Abcb1a* mRNS szintje a szülői és a rezisztens sejtekben is jóval magasabb, mint az *Abcb1b* szintje, azonban az *Abcb1b* expresszió-növekedésének különbsége a szülői és a rezisztens sejtek között sokkal nagyobb léptékű (col500 esetén kb. 15-szörös, col1000 esetén kb. 20-szoros), mint az *Abcb1a* expresszió-növekedésének különbsége (col500 esetén kb. 8-szoros, col1000 esetén kb. 4-szeres).

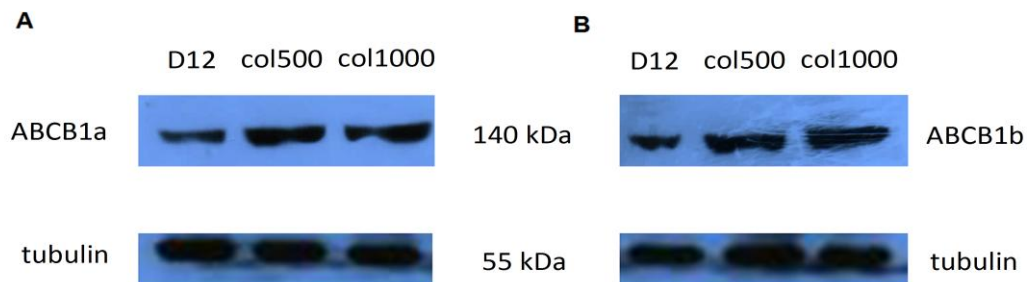


5. Ábra Az *Abcb1* gén expressziója megemelkedett a drog-rezisztens sejtvonalakban. A gén expresszióját QPCR-al határoztam meg. A D12 sejtek *Abcb1b* expresszióját tekintetem 1-nek, a többi adatot ehhez képest ábrázoltam. **(A)** *Abcb1a* expresszió, **(B)** *Abcb1b* expresszió. * $p < 0.05$

Az fenti kísérletek tehát megerősítették azt a feltételezést, miszerint az *Abcb1* gén kifejeződésében bekövetkezett változások közrejátszhatnak a rezisztens sejtek megemelkedett drog efflux aktivitásában.

4.3. A drog-rezisztens sejtekben az ABCB1b fehérje szintje is magasabb

Miután real-time PCR módszerrel kimutattam, hogy a drog-rezisztens sejtekben az *Abcb1* génekről képződött mRNS-ek mennyisége magasabb, mint a szenzitív sejtekben, felmerült a kérdés, hogy vajon ez az eltérés fehérje-szinten is megmutatkozik-e? Ennek tesztelésére a sejtvonalakból össz-fehérje mintát izoláltam, majd ABCB1a és ABCB1b specifikus ellenanyagok segítségével Western-blot kísérletet végeztem. Ennek során azt tapasztaltam, hogy az ABCB1a (6.A ábra) és ABCB1b (6.B ábra) fehérjék között látszólag nincs jelentős különbség a sejtvonalakban. Amennyiben a sejtvonalak között hasonlítjuk össze a két fehérje mennyiségét, azt látjuk, hogy míg az ABCB1b esetén a col500 és col1000 sejtekben kismértékben megemelkedett a fehérje szintje a D12 sejtekben detektált mennyiséghez képest (6.B ábra), addig az ABCB1a esetén ez a különbség még kevésbé számottevő (6.A ábra).

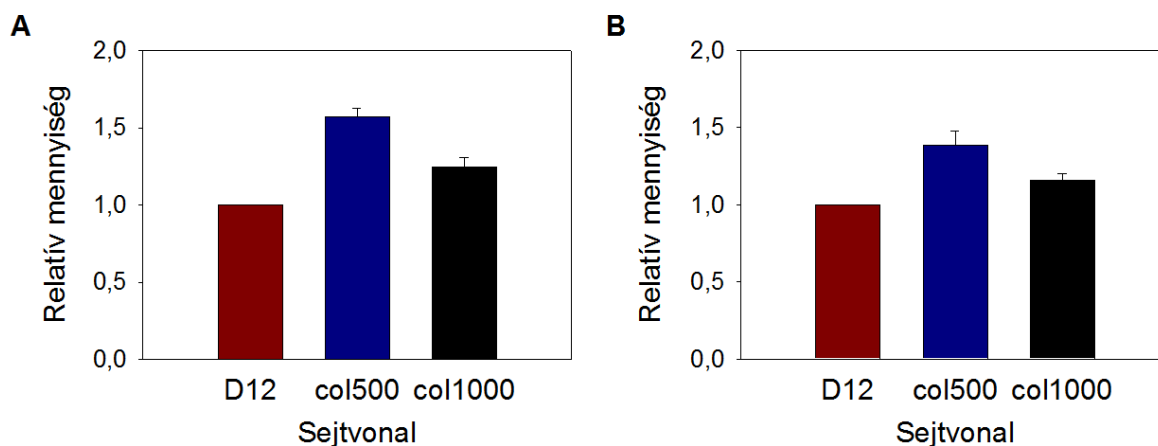


6. Ábra A drog-rezisztens sejtekben az ABCB1b fehérjék mennyisége megemelkedett. Az ABCB1 fehérjék mennyiségét Western-blot-tal határoztam meg. (A) ABCB1a, (B) ABCB1b. Loading kontroll: tubulin

4.4. A megemelkedett *Abcb1* expressziót nem az őket kódoló gének amplifikációja okozza

Számos irodalmi adat utal arra, hogy különböző drog-rezisztens sejtekben a megnövekedett *Abcb1* expresszió hátterében az őket kódoló gének kópiaszámának megemelkedése (is) állhat [115]. Annak tesztelésére, hogy az általam vizsgált drog-rezisztens patkány hepatoma sejtekben előzőleg megfigyelt magasabb *Abcb1* mRNS szintek kialakításában vajon szerepet játszik-e az őket kódoló gének amplifikációja, összehasonlítottam az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének kópiaszámát a drog-szenzitív és a drog-rezisztens sejtvonalak között.

Ennek érdekében mindhárom sejtvonalból genomi DNS-t izoláltam, majd az általam tervezett, *Abcb1a*- és *Abcb1b*-specifikus primerek felhasználásával QPCR analízist hajtottam végre. Az eredmények csupán minimális eltéréseket mutattak az *Abcb1a* (7.A ábra) és az *Abcb1b* (7.B ábra) genomi régiók mennyiségei között összehasonlítva a D12 és a rezisztens sejtvonalakat. Ez utalhat a mérés pontatlanságára, vagy arra, hogy a sejtvonalak heterogén populációt alkotnak, egy részükben 1, míg másik részükben 2 példányban vannak jelen az *Abcb1* gének.



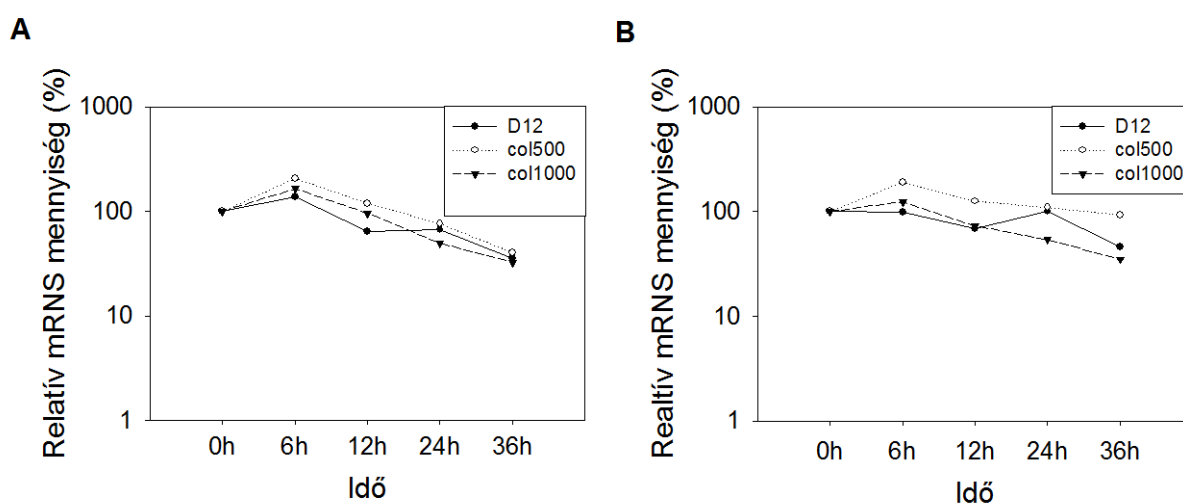
7. Ábra Az *Abcb1* gén kópiaszáma nem különbözik jelentős mértékben a szenzitív és a rezisztens sejtvonalak között. A sejtvonalakból izolált genomi DNS mintákon *Abcb1a*- és *Abcb1b*- specifikus primerek felhasználásával, QPCR analízis segítségével meghatároztam a szóban forgó gén kópiaszámát. **(A)** *Abcb1a* kópiaszám, **(B)** *Abcb1b* kópiaszám

Következtetésként tehát elmondható, hogy a korábban a szenzitív és a rezisztens sejtvonalak között megfigyelt mRNS- és fehérje-szint különbségeket a szóban forgó gének amplifikációja egyedül nem okozhatja.

4.5. A drog-rezisztens sejtekben stabilabb az *Abcb1b* mRNS

A szakirodalomban fellelhető adatok alapján a drog-rezisztens sejtekben detektált megemelkedett *Abcb1* mRNS szintet okozhatja a stabilitásukban bekövetkezett változás is [48]. Felmerült tehát a kérdés, hogy az általam vizsgált col500 és col1000 sejtvonalak esetén megfigyelhető-e az *Abcb1* génekről átíródott mRNS-ek fél-életidejének meghosszabbodása, mely szerepet játszhat a bennük detektált magas mRNS szint kialakulásában. Ezen kérdés megválaszolására mindhárom sejtvonalban gátoltam a transzkripciót actinomicyn D kezelés segítségével, majd a kezeléstől számított 6, 12, 24 és 36 órával összegyűjtött sejtekben megvizsgáltam az *Abcb1a* és *Abcb1b* mRNS-ek mennyiségét. Mivel az actinomicyn D hatására a génátírás teljesen leáll, ezért a kezelés pillanatától kezdve csak a már korábban elkészült mRNS-ek találhatók meg a sejtekben, új mRNS-ek már nem képződnek, így

nyomon lehet követni a kérdéses mRNS szintjét, ami indikálja annak stabilitását. Minél kisebb egy mRNS stabilitása, annál gyorsabban bomlik el (rövidebb a fél-életideje). A kísérletet elvégezve azt tapasztaltam, hogy *Abcb1a* esetén nem mutatható ki jelentős különbség a szenzitív és rezisztens sejtek mRNS mennyiségében (8.A ábra), azonban az *Abcb1b* mRNS mennyisége szinte az összes vizsgált időpontban magasabb volt a rezisztens sejtekben (8.B ábra).



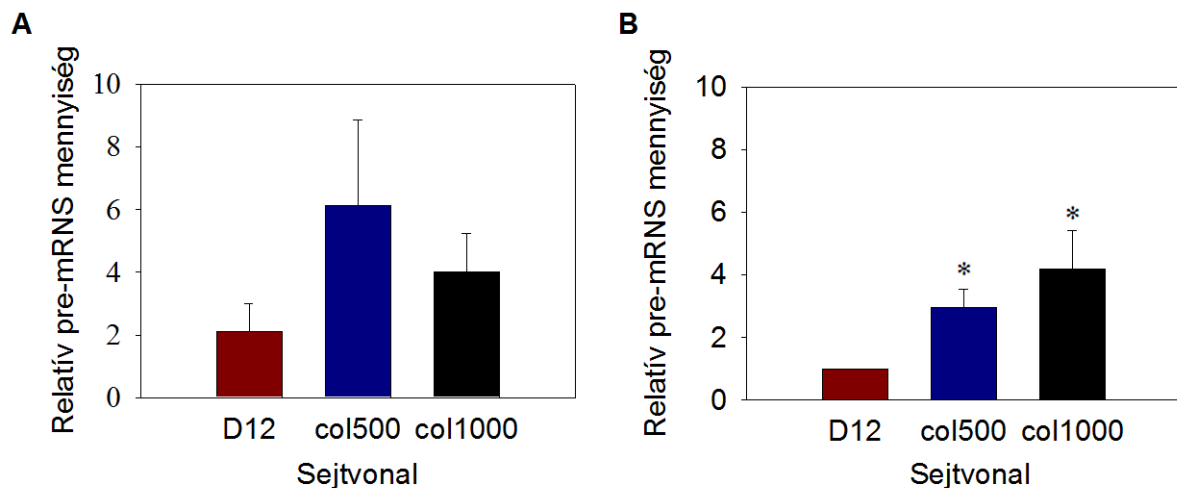
8. Ábra Az *Abcb1b* mRNS stabilabb a drog-rezisztens sejtekben. Actinomicyn D kezelés után 6, 12, 24 és 36 órával a sejteket összegyűjtöttem, és a bennük lévő *Abcb1a* és *Abcb1b* mRNS-ek mennyiségét QPCR-ral meghatároztam. A kezeletlen, 0 órás kontrollban mért mRNS-ek mennyiségét 1-nek tekintettem, a többi adatot ehhez képest ábrázoltam. **(A)** *Abcb1a* mRNS mennyiségének változása, **(B)** *Abcb1b* mRNS mennyiségének változása.

A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy az *Abcb1b* mRNS stabilabb a col500 és col1000 sejtekben. Ez a hosszabb fél-életidő közreműködhet a bennük megfigyelt magasabb mRNS szint létrehozásában.

4.6. A megemelkedett *Abcb1a* és *Abcb1b* expresszióért elsődlegesen a transzkripciójuk aktivációja felelős

Az élő sejtekben a folyamatosan változó körülményekhez (környezeti tényezők, stressz, sejtciklus, metabolizmus, stb.) való alkalmazkodás egyik alapfeltétele a gének átírásának pontos és szigorú szabályozása. Ennek megvalósításához a sejtek számos mechanizmust fejlesztettek ki, ezek közül az egyik legfontosabb és leggyakrabban alkalmazott módszer a transzkripció inicializációjának a szabályozása. Az *Abcb1* gének expressziója esetén sincs ez másképp, szabályozásuk több szinten végbemenő igen összetett és bonyolult folyamatok eredménye. Miután megvizsgáltam a génamplifikáció és az mRNS-stabilizáció lehetséges szerepét a multidrog rezisztens sejtekben megfigyelt, a szenzitív sejtekhez képest magasabb *Abcb1* mRNS szintek kialakításában, következő lépésben arra voltam kíváncsi, vajon a gének átírásának intenzitása különbözik-e a sejtvonalak között.

Ennek vizsgálatára az *Abcb1a* és *Abcb1b* génekről elsőként képződő éretlen mRNS-ek (pre-mRNS) szintjének meghatározása egy elfogadott módszer, mivel ezen mRNS-féleségek rövid fél-életidővel rendelkeznek, így a mennyiségük meghatározása pontosabb információt ad a transzkripció intenzitásáról, mint az érett mRNS-ek szintjének vizsgálata. A pre-mRNS-ek, mivel még nem estek át az ún. splicing mechanizmuson, tartalmazzák a génekről átíródott intron szekvenciákat, ezért egy megfelelő primerpár segítségével, melynek egyik tagja egy ilyen intronikus szekvenciához kapcsolódik, könnyen kimutathatóak, elkülönítve őket az érett mRNS-ektől. Az *Abcb1a* 4. exonjához és 4. intronjához, valamint az *Abcb1b* 3. exonjához és 3. intronjához hibridizáló primerpárok segítségével D12, col500 és col1000 sejtekből preparált össz RNS mintákon QPCR-t végeztem, és azt tapasztaltam, hogy a rezisztens sejtvonalakban mind az *Abcb1a* mind az *Abcb1b* pre-mRNS mennyisége magasabb a szenzitív sejtvonalban mért értékekhez képest (9.A és B ábra).



9. Ábra A rezisztens sejtekben fokozott *Abcb1* transzkripció folyik. A génekről képződött pre-mRNS-ek mennyiségét QPCR-al határoztam meg. A D12 sejtekben detektált *Abcb1b* pre-mRNS mennyiségét tekintetem 1-nek, a többi adatot ehhez képest ábrázoltam. **(A)** *Abcb1a* pre-mRNS, **(B)** *Abcb1b* pre-mRNS. * $p < 0.05$

A fenti eredmény tükrében kijelenthető, hogy az *Abcb1* gének transzkripciója magasabb szinten folyik a drog-rezisztens sejtekben, ami magyarázattal szolgál a bennük korábban kimutatott megemelkedett mRNS szint kialakulására.

4.7. A D12, col500 és col1000 sejtvonalak *Abcb1a* és *Abcb1b* szabályozó régióinak összehasonlítása

A megemelkedett génexpresszió gyakran a gén promóter régiójában található transzkripciós faktorok és szabályozó fehérjék kötőhelyeiben bekövetkezett mutáció(k) eredménye, ezért felmerült a kérdés, hogy a col500 és col1000 sejtek *Abcb1* génjeinek szabályozó régióiban kimutatható-e bármiféle eltérés a D12 sejtek hasonló régióihoz képest. Ennek megválaszolására a sejtvonalakból izoláltam mind az *Abcb1a*, mind az *Abcb1b* gének 5' nemtranszlálódó régióit (5' UTR) megelőző szabályozó szakaszok kb. 1500 bázispár hosszúságú részeit, majd meghatároztam azok szekvenciáját.

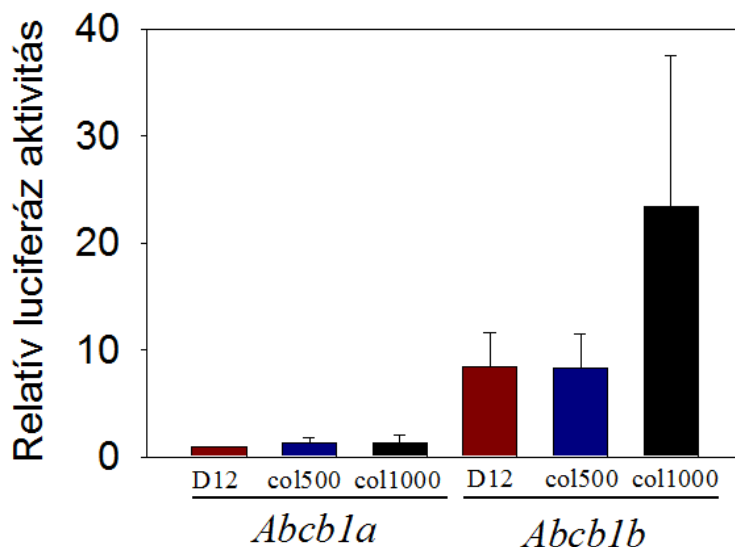
A kapott szekvencia adatok az első 5-600 bázispárig megbízhatónak tűntek. Az eredmények alapján a három sejtvonal szabályozó régiója között nem látható eltérés, azok tökéletesen egyformák. Az *Abcb1b* esetén az irodalmi adathoz képest mindhárom sejtvonalban találtam 1 pontmutációt/SNP-t az 5' UTR előtt a -41-es pozícióban, ami egy T-A cserét jelent, valamint egy deléciót (egy A hiányt) a -57-es pozícióban, de a számítógépes vizsgálatok alapján ezek a különbségek nem érintenek a gén transzkripciójában szerepet játszó kötőhelyet (2. függelék).

4.8. Az *Abcb1* promóter fragmentumok hasonló aktivitást mutatnak a drog-szenzitív és a drog-rezisztens sejtvonalakban

A col500 és col1000 sejtekben az *MDR1* génnek fokozottabb átírása figyelhető meg, mint a D12 sejtvonalban. Miután a gének szabályozó régióiban nem találtam eltérést a sejtvonalak között, ezért következő lépésben arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a transzkripciót szabályozó faktorok tekintetében van-e eltérés a szenzitív és a rezisztens sejtvonalak között. Ehhez olyan plazmidokat állítottam elő, melyek külön-külön a D12 sejtekből izolált, *Abcb1a* illetve *Abcb1b* gének szabályozó régióinak kb. 1500 bp hosszúságú részét a szentjánosbogár luciferáz enzimét kódoló riporter gén előtt tartalmazzák. A plazmidokat D12, col500 és col1000 sejtekbe transzfektáltam, majd meghatároztam a minták luciferáz aktivitását. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a sejtvonalak között sem az *Abcb1a* sem az *Abcb1b* promóterek aktivitásában nincs jelentős eltérés (10. ábra). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a drog-rezisztens sejtekben megfigyelt, fokozott *MDR1* expresszió nem a bennük lévő transzkripciós faktorok fokozott aktivitásának/mennyiségének köszönhető. Mivel a plazmidok a kromoszómális környezetükből kiragadott promóter fragmentumokat tartalmazzák, ennél fogva az ilyen típusú vizsgálatok során a kromatinszerkezet génexpressziójára gyakorolt hatása nem tud érvényesülni. Ez a tény és a fenti eredmény azt sugallja, hogy a rezisztens sejtekben tapasztalt megemelkedett *Abcb1* expresszió létrehozásában epigenetikai tényezők játszanak fontos szerepet.

A kísérlet egy másik váratlan eredményt is hozott: amennyiben a promóterek aktivitását hasonlítjuk össze, az *Abcb1b* promóter mindhárom sejtvonalban jelentősen magasabb aktivitást mutat, mint az *Abcb1a*, annak ellenére, hogy *in vivo* az *Abcb1a* mRNS mennyisége

jóval magasabb, mint az *1b* mennyisége. Ez az érdekes megfigyelés egyrészt magyarázható azzal, hogy az *Abcb1a* gén általam vizsgált kb. 1500 bp hosszúságú szabályozó szakasza előtt esetleg olyan fontos aktivátor elemek találhatóak, melyek a plazmid konstrukcióba nem kerültek beépítésre; másrészt szintén arra enged következtetni, hogy az *MDR1* gének expresszióját epigenetikai tényezők is befolyásolják.



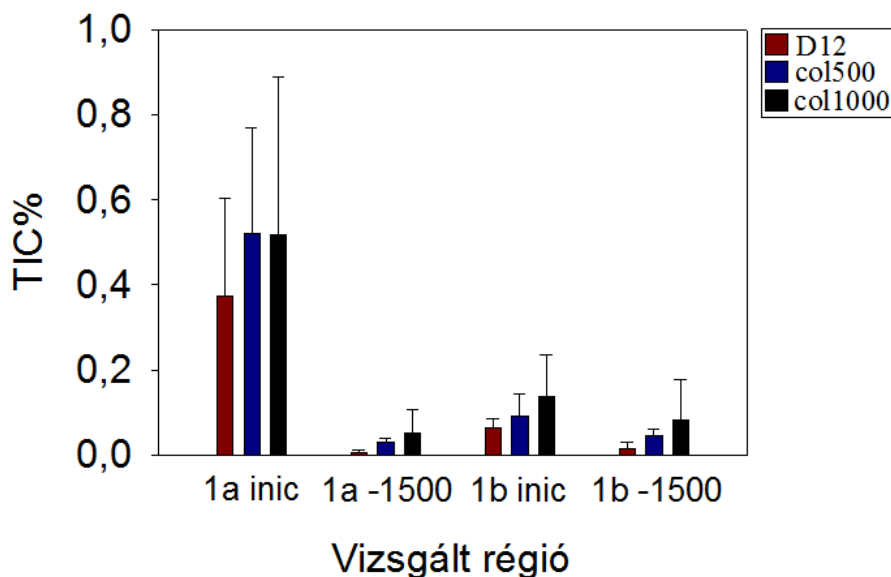
10. Ábra Az *Abcb1* gének promóter régióinak aktivitása. Az *Abcb1a* és az *Abcb1b* promóter fragmentumokat tartalmazó luciferáz riporter plazmidokat D12, col500 és col1000 sejtekbe juttattam, majd meghatároztam a luciferáz enzim aktivitását. Az *Abcb1a* promóter fragmentum D12 sejtekben mutatott aktivitását 1-nek tekintettem, és a többi aktivitást ehhez viszonyítva ábrázoltam.

4.9. Az *Abcb1* gének szabályozó régióiban az acetilált hiszton 3 lizin 9 (H3K9ac) oldalláncok mennyisége hasonló a szenzitív és a rezisztens sejtekben

A hiszton fehérjék kovalens módosításai - különösen azok acetilációja - jelentős szerepet játszanak a génkifejeződés szabályozásában [66]. Ennek tudatában szerettem volna megvizsgálni az *Abcb1* gének szabályozó régióit arra fókuszálva, hogy vajon látható-e különbség azok hiszton acetilációs mintázata között a drog-szenzitív és drog-rezisztens

sejtvonalakban. Ezért a transzkripcionálisan aktív gének promóter régióiban gyakran megfigyelhető acetilált hiszton 3 lizin 9 [116] mennyiségét határoztam meg és hasonlítottam össze a sejtvonalak között, így próbálva alátámasztani azon hipotézisemet, miszerint a rezisztens sejtekben megfigyelt fokozott *Abcb1a* és *Abcb1b* génexpresszió egyik kiváltó oka a gének promótereiben az acetilált H3K9 magasabb mennyisége.

Kromatin immunoprecipitációval (ChIP) vizsgáltam az *Abcb1* gének transzkripció start helyeinek környezetében (1a inic, 1b inic) illetve az azoktól upstream irányba 1500 bp-ra lévő régióiban (1a -1500, 1b-1500) az acetilált H3K9 mennyiségét. Mindhárom sejtvonal esetén a vizsgált régiók közül az *Abcb1a* gén iniciátor régiójában a legmagasabb a H3K9ac mennyisége (11. ábra). Ez egybevág azzal az megfigyeléssel, miszerint az *Abcb1a* gén transzkripciója fokozottabb az *Abcb1b* gén transzkripciójánál mindhárom sejtvonalban. Amennyiben az acetilált H3K9 mennyiségét a D12, col500 és col1000 sejtek között hasonlítjuk össze azt látjuk, hogy nincs jelentős eltérés egyik régió esetében sem a szenzitív és a rezisztens sejtvonalakban detektált H3K9ac mennyiségek között (11. ábra). Ez az eredmény azonban éles ellentétben áll azzal a ténnyel, hogy a sejtvonalak között nagy eltérés mutatkozik az *Abcb1* gének expressziójában.



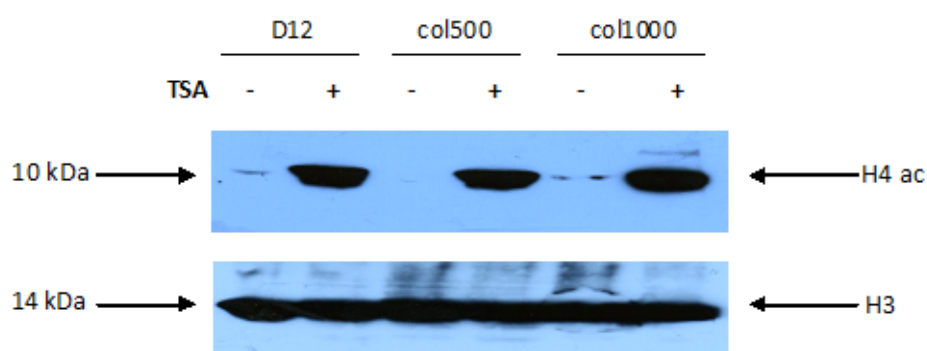
11. Ábra Az acetilált H3K9 mennyisége az *Abcb1* gének szabályozó régióiban.

Kromatin immunoprecipitációval vizsgáltam a H3K9ac mennyiségét az *Abcb1a* és *1b* gének iniciátor és -1500 régióiban. A QPCR-al meghatározott, H3K9ac ellenanyag által kötött genomi régiók mennyiségét a teljes bemért kromatin %-ában (TIC%) ábrázoltam.

4.10. A két *Abcb1* gén eltérően reagál hiszton deacetiláz inhibitor (HDACi) kezelésre

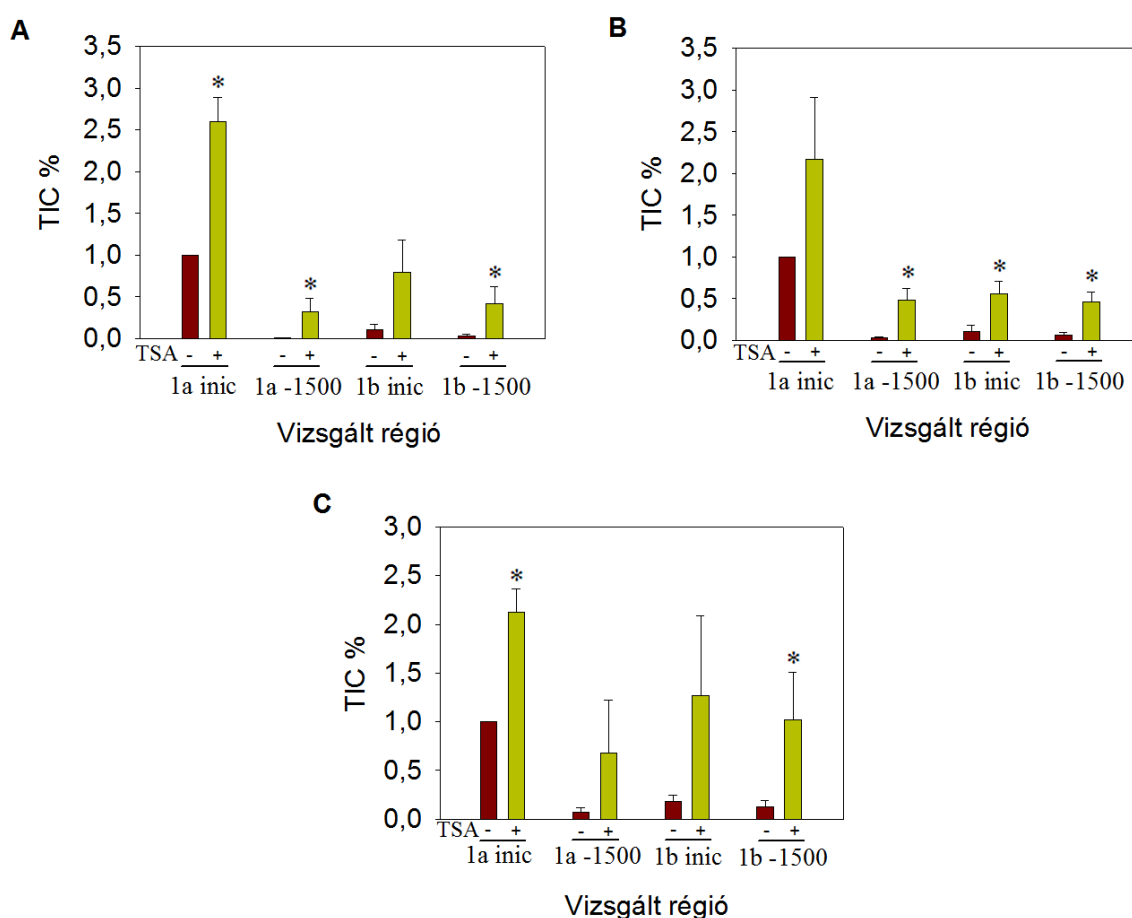
Mivel nem sikerült lényeges eltéréseket kimutatnom az acetilált H3K9 mennyiségében az *Abcb1* gének szabályozó régióiban a szenzitív és rezisztens sejtvonalak között, ezért felmerült bennem a kérdés, hogy egyáltalán a hiszton fehérjék acetilációjának van-e bármiféle szerepe az *MDR1* gének expressziójának szabályozásában az általam vizsgált patkány hepatoma sejtekben. Ennek megválaszolására a sejteket hiszton deacetiláz inhibitor trichostatin A-val kezeltem, hogy fenntartsam bennük a hiszton acetiláció magas szintjét, így vizsgálva a hiszton acetiláció *Abcb1* génexpressziójára gyakorolt hatását.

Első lépésben a TSA kezelés hatékonyságát Western-blot technika alkalmazásával vizsgáltam. Irodalmi adatok alapján a sejteket 50 ng/ml koncentrációjú TSA jelenlétében növesztettem 6 órán keresztül, majd Western-blot segítségével bizonyítottam, hogy a TSA-val kezelt sejtekben jelentősen megemelkedett az acetilált hiszton 4 fehérjék mennyisége mindhárom sejtvonalban (12. ábra).



12. Ábra A TSA kezelés hatása az acetilált H4 mennyiségére. D12, col500 és col100 sejteket TSA nélkül (-) vagy TSA jelenlétében (+) növesztettem 6 órán keresztül. Az inkubációs idő lejárta után Western-blot technikával vizsgáltam az acetilált H4 fehérjék mennyiségét. Loading kontroll: H3.

Ezután ChIP technikával megvizsgáltam az *Abcb1* gének előző bekezdésben tárgyalt régióiban az acetilált hiszton 3 lizin 9 mennyiségét a kezelt és kezeletlen sejtekben. Az eredményekből egyértelműen kiolvasható, hogy a HDACi kezelés hatására jelentősen megemelkedett a H3K9ac mennyisége mindkét gén mindkét vizsgált régiójában a D12 (13.A ábra), col500 (13.B ábra) és col1000 (13.C ábra) sejtek esetén is.

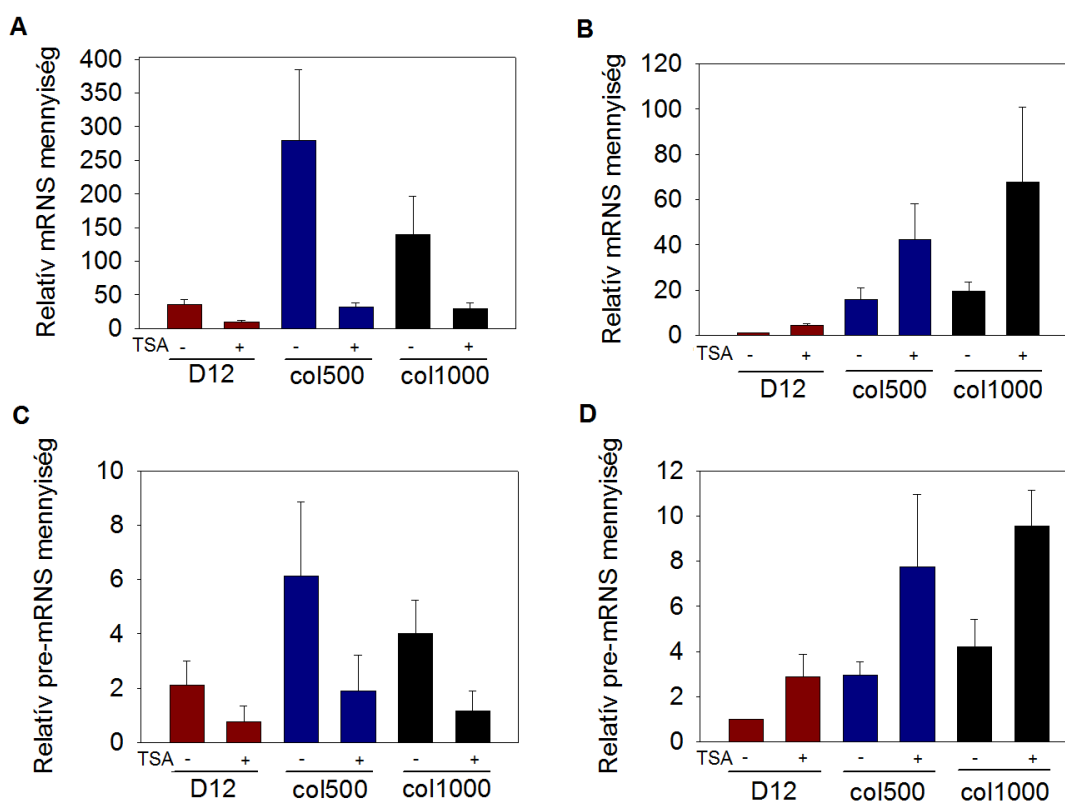


13. Ábra A TSA kezelés hiszton acetilációra gyakorolt hatásának vizsgálata.

Kromatin immunoprecipitációval vizsgáltam a H3K9ac mennyiségét az *Abcb1a* és *1b* gének iniciátor és -1500 régióiban, TSA nélkül (-) és TSA jelenlétében (+). A QPCR-ral meghatározott, H3K9ac ellenanyag által kötött genomi régiók mennyiségét a teljes bemért kromatin %-ában (TIC%) ábrázoltam. H3K9ac a D12, (A) col500 (B) és col1000 (C) sejtekben. * $p < 0.05$

Ennek ismeretében következhetett a TSA kezelés *MDR1* gén expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálta. Kvantitatív valós idejű PCR-rel analizálva a kezelt és kezeletlen sejtekből származó mintákat igen meglepő eredményt kaptam. A trichostatin A hatására mindhárom sejtvonalban csökkent az *Abcb1a* mRNA szintje, míg az *Abcb1b* mRNA mennyisége nőtt a kezeletlen kontrollhoz képest (14.A és B ábra).

Annak kiderítésére, hogy a TSA kezelés eme felettébb érdekes eredménye valóban annak génexpresszióra gyakorolt hatásból származik-e, megvizsgáltam az *Abcb1a* és *1b* génekről átíródott pre-mRNS-ek mennyiségét, ami hűen tükrözi a génexpresszió intenzitásában bekövetkezett esetleges változásokat. Hasonlóan az mRNA szintek esetén tapasztaltakkal, a pre-mRNS-ek vizsgálata is ugyanazt az eredményt hozta: TSA kezelés hatására a szenzitív és rezisztens sejtvonalakban egyaránt az *Abcb1a* gén átírásának intenzitása lecsökken (14.C ábra), míg az *Abcb1b* gén expressziója fokozódik (14.D ábra) a kezeletlen mintákhoz képest.

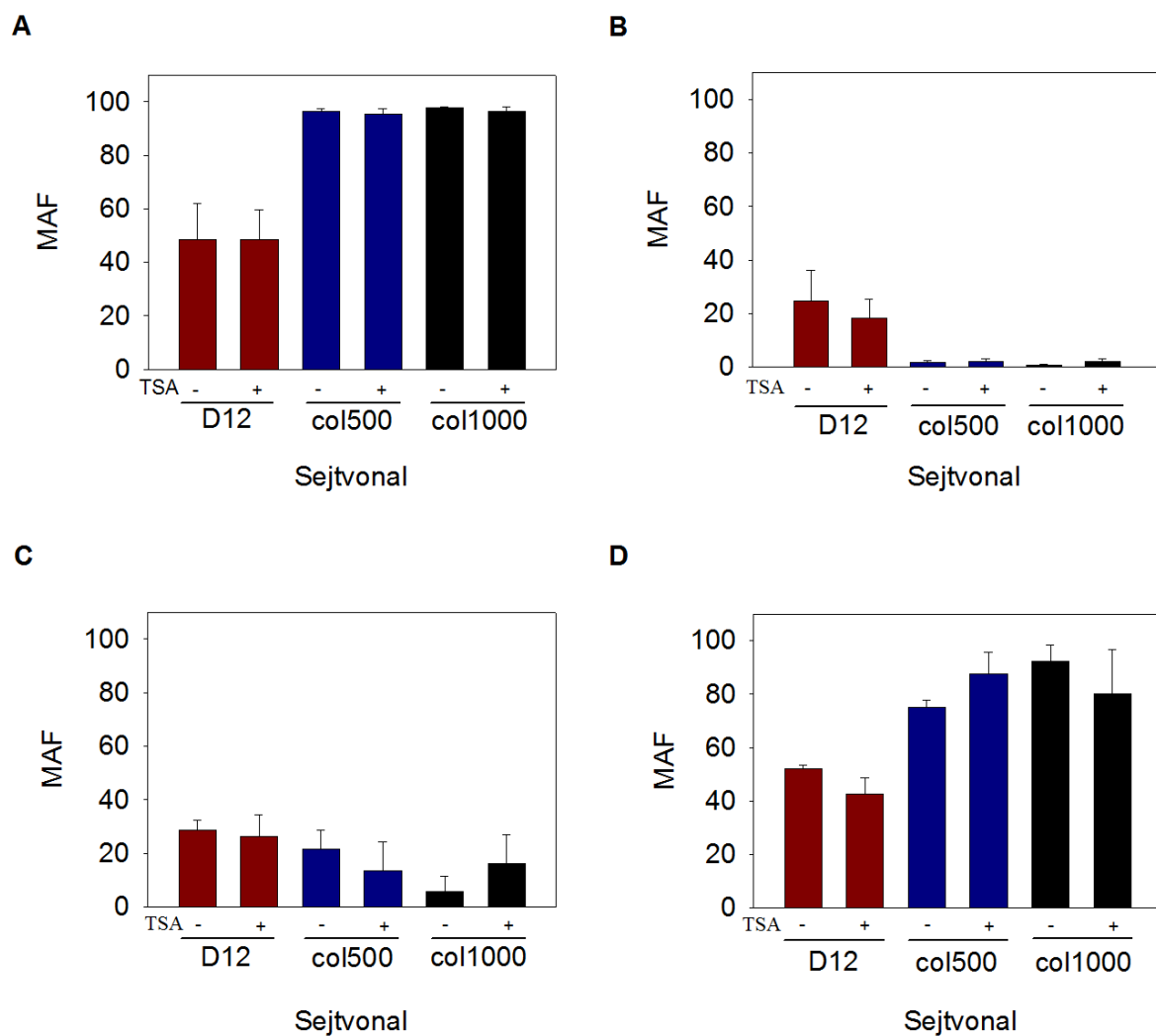


14. Ábra A TSA kezelés ellentétesen hat az *Abcb1* gén transzkripciójára. A 6 órás TSA kezelés *Abcb1a*, (A) és *Abcb1b* (B) expressziójára gyakorolt hatását QPCR-rel vizsgáltam. Azt, hogy a TSA kezelés valóban a génexpressziót aktiválta, az újonnan képződött pre-mRNS-ek expresszióját is meghatároztam. (C) *Abcb1a* pre-mRNS, (D) *Abcb1b* pre-mRNS.

Összefoglalva, a hiszton deacetiláz inhibitor kezelés hatására mindhárom sejtvonalban az *Abcb1a* mRNS mennyisége lecsökkent, míg ezzel ellentétben az *Abcb1b* mRNS mennyisége megnövekedett. A detektált változások valóban a megváltozott génexpresszió eredményei, ugyanis a pre-mRNS-ek vizsgálata is a fenti tendenciát mutatta. Ezek alapján kijelenthető, hogy a TSA eltérő módon befolyásolja az *MDR1* gének kifejeződését.

4.11. A HDACi kezelés nem befolyásolja az ABCB1 és ABCC1 pumpák aktivitását

Mivel a TSA kezelés az *Abcb1* gének expressziójának (ellentétes irányú) megváltozását okozta, kíváncsi voltam, hogy a kezelés a sejtek drog-efflux képességére gyakorol-e bármiféle hatást. Ennek eldöntésére a D12, col500 és col1000 sejteket TSA-val kezeltem, majd a MultiDrugQuant Assay Kit-et felhasználva meghatároztam a kezelt és kezeletlen sejtek ABCB1 és ABCC1 pumpa aktivitás értékeit. A méréseket elvégezve megállapítottam, hogy a TSA kezelés nincs hatással sem az ABCB1, sem az ABCC1 pumpák aktivitására a vizsgált sejtvonalak egyikében sem (15. ábra).



15. Ábra A TSA kezelés nem befolyásolja a vizsgált ABCB transzporterek aktivitását. A 6 órás TSA kezelést követően MultiDrugQuant Assay Kit segítségével megállapítottam a sejtvonalak transzporter fehérjéinek aktivitás értékeit. **(A)** ABCB1 aktivitás, **(B)** ABCC1 aktivitás, **(C)** ABCB1a aktivitás, **(D)** ABCB1b aktivitás.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A rákos sejtek kemoterápiás szerekkel szemben mutatott rezisztenciája jelentősen csökkent a rákellenes terápia hatékonyságát és ezzel együtt a beteg túlélési esélyeit [10]. Míg egyes daganatok természetes rezisztenciát mutatnak, addig másokban a kemoterápiás kezelés hatására alakulhat ki az ún. szerzett drog rezisztencia [15]. Utóbbi egy igen sajátos problémát jelent a daganatos betegek kezelésében, mivel a rákos sejtek nem csak az eredetileg alkalmazott droggal, hanem más, szerkezetükben és/vagy hatásmechanizmusukban különböző szerekkel szemben is rezisztenciát mutathatnak [11]. A tumorsejtek eme szerzett multidrog rezisztencia fenotípusa számos módon kialakulhat. Ezek közül az egyik legintenzívebben tanulmányozott mechanizmus során megnövekszik a toxikus vegyületek sejtből való kipumpálásának mértéke. Ezért a jelenségért elsősorban az ABC transzporter családba tartozó ABCB1/MDR1/P-gp fehérje fokozott aktivitása tehető felelőssé [25]. A megnövekedett ABCB1 aktivitást számos mechanizmus előidézheti. A drog-rezisztens sejtekben génamplifikáció [115], kromoszóma-transzlokáció [117] és mRNS-stabilizáció [48] gyakran közreműködik a megemelkedett ABCB1 szint létrehozásában. Ezen faktorok mellett fontos szerepet játszanak az ABCB1 gén transzkripciójának aktivitásában bekövetkezett változások is. Az MDR1 génkifejeződését számos transzkripciós faktor, tumor szuppresszor és onkogén szabályozza (lásd 1.4.7. fejezet), valamint egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az epigenetikai faktorok (hisztón acetiláció, DNS metiláció) szabályozó szerepének is (lásd 1.5.2. fejezet).

A munkám során használt multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtvonalakról korábban kimutatták, hogy bennük az ABCB1 fehérje mennyisége jelentősen megemelkedett a szenzitív anyai sejtvonalban detektált mennyiséghez képest, valamint ezek a sejtek magasabb drog-efflux aktivitást is mutattak [108, 109]. Irodalmi adatok alapján a rákos sejtek MDR fenotípusának kialakításában más ABC transzporterek, mint például az ABCC1 is szerepet játszhatnak [23], ezért első lépésben a sejtvonalak transzporter-aktivitását vizsgáltam meg. A korábban alkalmazott módszernél érzékenyebb és specifikusabb Calcein-assay felhasználásával alátámasztottam a korábbi eredményeket, miszerint a rezisztens sejtekben az ABCB1 transzporter aktivitása jelentősen megemelkedett. Ez a változás olyan nagymértékű, hogy megközelítette az elméletileg elérhető legmagasabb, 100%-os aktivitás-értéket. Meglepő módon az ABCC1 transzporter aktivitása azonban ezzel ellentétesen változott: a szenzitív

sejtekben aktívabb pumpa a rezisztens sejtekben szinte inaktiválódott. Mivel a rágsálók genomja két ABCB1 transzporter izoformát kódol [105], és a korábbi vizsgálatok során a szegedi kutatók nem különítették el ezek működését a sejtvonalakban, ezért következő lépésben az ABCB1b-specifikus gátlószer vinblastine [114] felhasználásával különböztettem meg az ABCB1 transzporterek aktivitását. A kapott eredmények alapján a két izoforma aktivitási mintázata között jelentős különbség fedezhető fel. A D12 sejtekben mért ABCB1a aktivitás kb. fele az ABCB1b esetén mért értéknek, a rezisztens sejtekben ez az alacsony aktivitás még tovább csökken, míg ezzel párhuzamosan a magasabb aktivitást mutató 1b izoforma aktivitása tovább nő a col500 és col1000 sejtekben. A fenti eredmények alapján kijelenthető, hogy a vizsgált rezisztens sejtek MDR-fenotípusa az ABCB1b transzporter fokozott működésének köszönhető. Fontos megjegyezni, hogy a D12 sejtekben is jelentősnek mondható ABCB1a és ABCB1b aktivitást detektáltam, ami némi magyarázatra szorul. Korábban több csoport is kimutatta, hogy rágsálókban a hepatokarcinogenezis és a dexamethasone kezelés az *Abcb1* gén aktivációját idézi elő [118, 119], ennek tükrében nem meglepő, hogy a dexamethasone-on szelektált hepatoma sejtek egy normál májsejtnél magasabb ABCB1 transzporter aktivitást mutattak.

Az aktivitás-vizsgálatok során felfedezett különbségeket látva megfogalmazódott a kérdés, miszerint az *Abcb1* gén expressziójában történtek-e olyan változások, melyek megmagyarázhatják a fent leírt megfigyeléseket. Ennek megválaszolásához a sejtvonalakban az *Abcb1a* és *1b* génekről képződött mRNS-ek mennyiségét real time PCR technika segítségével határoztam meg. Annak ismeretében, hogy az ABCB1b transzporter mindhárom sejtvonalban jóval magasabb aktivitással bír, mint az ABCB1a, meglepő módon az őket kódoló mRNS-ek mennyisége ennek épp az ellenkezőjét mutatta: mindegyik sejtvonalban jelentősen magasabb *Abcb1a* mRNS szintet detektáltam, mint *Abcb1b*-t. A rezisztens sejtekben a szenzitív sejtekhez képest mindkét mRNS mennyisége megnőtt, azonban az *Abcb1b* esetén a lépték jóval magasabb volt, mint az *Abcb1a* esetén. Az eddigi vizsgálatok eredményei alapján joggal feltételezhető, hogy a col500 és col1000 sejtek MDR fenotípusának kialakulásában az ABCB1 transzportereket kódoló gén expressziójában bekövetkezett változások kulcsszerepet játszanak. Azonban ahhoz, hogy az aktivitásban látott különbségek létrejöjjenek, funkcióképes fehérjékre van szükség. Annak érdekében, hogy megvizsgáljam, vajon az mRNS-szinten feltárt különbségek fehérjeszinten is megjelennek-e, ABCB1a és ABCB1b specifikus ellenanyagok felhasználásával Western blot kísérletet végeztem. Ennek során megállapítottam, hogy míg az ABCB1b fehérje mennyisége a drog-

rezisztens sejtvonalakban kis mértékben megemelkedett a szenzitív sejtekben detektált mennyiséghez képest, addig az ABCB1a esetén számottevő eltérést nem sikerült kimutatnom a sejtvonalak között. Mivel a Western blot egy szemi-kvantitatív eljárás, amit befolyásolhat többek között a felhasznált ellenanyagok minősége, ezért annak eredménye nem feltétlenül feleltethető meg 100%-ban a real time PCR-rel detektált mRNS-szintek által előrevetített eredményeknek. Továbbá az tény, miszerint sok esetben csupán gyenge korreláció figyelhető meg egy bizonyos mRNS mennyisége (a transzkripció) és a róla képződő fehérje mennyisége (azaz a transzláció) között [120], szintén magyarázatot adhat a fenti különbségekre. Elmondható, hogy az *Abcb1b* expressziója mRNS-szinten jelentősen, fehérjeszinten kismértékben megemelkedett a drog-rezisztens sejtekben, ami magyarázatot adhat a transzporter magas aktivitására. De mi okozhatja a gén fokozott expresszióját?

Drog-rezisztens sejtekben a megemelkedett *Abcb1* mRNS szint létrehozásában több faktor is szerepet játszhat. Ezek közül gyakran megfigyelték a transzportereket kódoló gének amplifikációját [115]. A sejtvonalakat előállító kutatók Southern-blot technika alkalmazásával a rezisztens sejtekben nem találtak az MDR1 gén amplifikációjára utaló bizonyítékot. Mivel ők a két gént nem külön-külön vizsgálták, ezért *Abcb1a*- és *Abcb1b*- specifikus primerek felhasználásával, genomi DNS templáton real time PCR analízist végeztem annak eldöntésére, hogy a rezisztens sejtekben az *Abcb1* gén kópiaszáma megváltozott-e. A kísérlet során mindkét gén kópiaszámában csupán minimális (kevesebb, mint kétszeres) eltéréseket fedeztem fel a D12 és a rezisztens sejtek között. A kapott eredményt két, egymástól független tényező figyelembevételével lehet értelmezni. Elképzelhető, hogy a rezisztens sejtek egy heterogén populációt alkotnak, azaz bizonyos sejtekben a gén kópiaszáma nem változott, míg más sejtekben kismértékű génamplifikáció történt. Emellett nem zárható ki a real time PCR esetleges pontatlansága sem. Mivel a szakirodalomban találunk példát arra vonatkozóan, hogy kolhicinen szelektált multidrog rezisztens egér sejtvonalakban akár több tízszeres, esetenként több százszoros kópiaszám-növekedést is detektáltak [121], ennek tükrében a col500 és col1000 sejtekben kimutatott magas mRNS-szintet a bennük feltételezett kismértékű génamplifikáció egyedül aligha magyarázza. Ezért felmerült a kérdés, hogy vajon az *Abcb1* mRNS-ek stabilitásának megnövekedése szerepet játszik-e a megemelkedett mRNS-szint létrehozásában? Ezen feltételezésemet többek között Yague és kollégáinak eredményei [48] alapján fogalmaztam meg, miszerint a drog-rezisztens sejtekben az MDR1 mRNS-ek fél-életideje jelentősen, akár tízszeresére is megnövekedhet. A kísérleteket elvégezve azt tapasztaltam, hogy míg az *Abcb1a* mRNS-ek esetén nem mutatható

ki jelentős különbség azok fél-életidejében a szenzitív és a rezisztens sejtek között, addig az *Abcb1b* mRNS-ek fél-életideje kismértékben ugyan, de megnövekedett a col500 sejtekben, de ez a növekedés közel sem annyira jelentős, mint amit a korábbi cikkekben leírtak, és ami magyarázatot adna a sejtvonalak között detektált 5-20-szoros nagyságrendű mRNS-mennyiségbeli különbségekre.

Mivel sem a génamplifikáció, sem az RNS-stabilitás vizsgálatából származó eredmények nem szolgáltak teljes magyarázattal a megnövekedett mRNS-mennyiség kialakulására, ezért következő lépésben az *Abcb1* gének transzkripcióját vettem górcső alá. Dolgozatom bevezetésében ismertettem az *MDR1* transzkripciójának sokrétű és bonyolult szabályozását (1.4.7. fejezet). Ezen információk alapján joggal feltételeztem, hogy a D12 és a rezisztens sejtek között tapasztalt mRNS-szint különbségek hátterében elsősorban a gének transzkripció-intenzitásának megváltozása állhat. A génekről képződő éretlen (pre-) mRNS-ek vizsgálata során sikerült kimutatnom, hogy a rezisztens sejtekben mind a pre-*Abcb1a*, mind a pre-*Abcb1b* mRNS nagyobb mennyiségben van jelen, mint a szenzitív sejtvonalban. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy helyes volt a feltevés, miszerint a drog-rezisztens sejtekben az *Abcb1* gének transzkripciója fokozottabb, mint a szenzitív sejtekben, és ez magyarázattal szolgálhat a col500 és col1000 sejtekben kimutatott szignifikánsan magasabb mRNS-szintek kialakulására is.

Az *Abcb1* transzkripciójának szabályozása igen összetett, melyet számos, a promóter régió konszenzus cisz-elemeihez kötődő transz-aktiváló fehérje bonyolult összjátéka határoz meg (lásd 1.4.7. fejezet). Az *MDR1* fokozott transzkripciójának egyik lehetséges kiváltó oka a gén szabályozó régiójában bekövetkezett mutáció(k) jelenléte [122, 123]. Amennyiben ezek a mutációk egy, az *Abcb1* transzkripcióját negatívan befolyásoló faktor kötőhelyét érintik, elképzelhető, hogy a faktor kötődésének hiányában a transzkripciós gátlás alól ily módon felszabaduló gén átírása megnövekszik. Ezek alapján felmerült a kérdés, hogy a rezisztens sejtekben detektált magasabb *Abcb1a* és *Abcb1b* expresszió létrehozásában a gének szabályozó régióiban bekövetkezett mutációk szerepet játszanak-e? Ezen lehetséges mutációk azonosításának érdekében mindhárom sejtvonalból izoláltam az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének promóter régióinak kb. 1500 bp hosszúságú szakaszait, melyek tartalmazzák a gének szabályozásában résztvevő legfontosabb ismert DNS-elemek jelentős részét, majd elvégeztem a szekvenciák összehasonlító vizsgálatát. Ennek során nem találtam eltéréseket a három sejtvonal vizsgált promóter szekvenciái között, ami arra utal, hogy a gének fokozott átírásának hátterében ez esetben nem a gének szabályozó régióinak mutációja áll. Mivel én a

promóter régiók csupán kb. 1500 bp hosszúságú szakaszait vizsgáltam, ezért elképzelhető, hogy a gének szabályozásában részt vevő, távolabbi DNS-elemek esetleges mutációja rejtve maradt. Érdekességgént megjegyezném, hogy a három sejtvonalból származó *1a* és *1b* promóter fragmentumokat az irodalmi adatokkal összevetve azt tapasztaltam, hogy azok egy pontmutációban és egy delécióban eltérnek a konszenzus szekvenciától, ám ezek a számítógépes analízis szerint egyik ismert szabályozó fehérje kötőhelyét sem érintik.

Mivel az előző kísérlet során kimutattam, hogy a rezisztens sejtek megemelkedett *Abcb1* expressziójában a gének promóterében bekövetkezett mutációk nagy valószínűséggel nem játszanak szerepet, a következő lépésben arra voltam kíváncsi, hogy ezekben a sejtvonalakban történt-e valamilyen változás a gének transzkripcióját szabályozó faktorok tekintetében. Ismerve az *MDR1* bonyolult transzkripciós szabályozását könnyen elképzelhető, hogy a génátírást fokozó számos transzkripciós faktor valamelyikének túltermelése/fokozott aktivitása; illetve a génátírást gátló faktorok valamelyikének hiánya/csökkent aktivitása állhat a col500 és col1000 sejtekben megfigyelt fokozott génátírás mögött. Amennyiben ez a feltételezés helyes, akkor a D12 sejtekből izolált promóter fragmentumot riporter gén elé építve, majd a konstrukciót a sejtvonalakba juttatva a rezisztens sejtekben magasabb riporter-aktivitást kell detektálnom, mint a szenzitív sejtekben. A kísérletet elvégezve azt tapasztaltam, hogy a sejtvonalak között mind az *1a*, mind az *1b* promóter fragmentumok hasonló aktivitást mutattak, annak ellenére, hogy a rezisztens sejtekben a gének fokozott transzkripciója zajlik. Ezt a látszólagos ellentmondást azonban könnyen feloldhatjuk: elképzelhető, hogy a szabályozó régiók általam vizsgált, kb. 1500 bp hosszúságú fragmentumai nem tartalmazzák azokat a fontos response elemeket, melyeken keresztül a col500 és col1000 sejtekben a transzkripció fokozott aktivációja végbemegy. Ez alapján kijelenthető, hogy azok a transzkripciós faktorok, melyek az *Abcb1* gének expressziójára gyakorolt hatásukat a promóter régiók általam vizsgált szakaszain belül lévő kötőhelyeiken keresztül fejtik ki, sem mennyiségükben, sem aktivitásukban nem különböznek a szenzitív és a rezisztens sejtek között. Továbbá, a plazmidokba épített promóter régiók használatának egyik nagy hátránya, hogy mivel ezek a kromoszómális környezetükből kiemelt szakaszok, így a kromatinszerkezet szabályozó hatása nem képes érvényesülni rajtuk. Amennyiben a sejtvonalakban az *Abcb1* gének eltérő expressziójában epigenetikai tényezők (is) szerepet játszanak, a fent alkalmazott riporter konstrukció nem alkalmas ezek felderítésére. A kísérlet eredményeit tovább vizsgálva feltűnik, hogy az *Abcb1b* promóter mindhárom sejtvonalban jóval magasabb luciferáz-aktivitást indukált, mint az *1a*, annak ellenére, hogy *in vivo* a sejtekben az *Abcb1a* mRNS

mennyisége szignifikánsan magasabb értékeket mutatott. Ennek lehetséges magyarázata, hogy az *Abcb1a* promóter régiójának 1500 bp-os szakasza előtt olyan fontos aktivátor elemek találhatóak, melyeket a plazmid konstrukció nem tartalmazott, így ezek transzkripcióra gyakorolt hatása nem érvényesülhetett.

Az *Abcb1* expresszióját szabályozó transzkripciós faktorok kötőhelyeikhez való hozzáférését a kromatinszerkezet befolyásolja. Az epigenetikai tényezők közül a DNS-metiláció és a hiszton acetiláció az *Abcb1* gén szabályozásában betöltött szerepét évek óta kitüntetett figyelemmel követik nyomon. Általánosságban elmondható, hogy az MDR1-negatív drog-szenzitív sejtekben az MDR1 gén promóter régióját egy represszív kromatin régió jellemzi, sok metilált CpG dinukleotiddal és kevés acetilált hiszton fehérjével, míg a fehérjét magas szinten expresszáló drog-rezisztens sejtek ezzel ellentétben egy sokkal nyitottabb kromatin struktúrát mutatnak, alacsony DNS-metilációval és sok acetilált hiszton fehérjével [76]. Emellett azonban olyan eredmények is napvilágot láttak, melyek szerint az MDR1 expressziójában a hiszton acetiláció fontosabb szerepet játszik, mint a promóter metiláció. Chen és munkatársai egészséges, valamint rákos, drog-szenzitív és drog-rezisztens hasnyálmirigy sejteket vizsgáltak. Kimutatták, hogy az egészséges sejtekben detektált értékhez képest az *Abcb1* expressziója a drog-szenzitív sejtekben ötszörösére, míg a drog-rezisztens sejtekben tízszeresére emelkedett. Ennek ellenére a belőlük származó promóter régiók vizsgálata nem tárt fel jelentős különbséget azok metilációs állapotára vonatkozóan, mindhárom esetben alacsony DNS-metilációt találtak. Ezek alapján feltételezték, hogy az általuk vizsgált hasnyálmirigy sejtekben a hiszton acetilációnak van kulcsfontosságú szerepe az *Abcb1* transzkripciójának szabályozásában [79]. Mivel az általam vizsgált sejtek közül az *Abcb1* gén a szenzitív sejtekben is kifejeződik, ezért feltételeztem, hogy a DNS-metiláció, hasonlóan a Chen-ék által vizsgált hasnyálmirigy-sejtekhez, ebben az esetben sem játszik domináns szerepet az *Abcb1* gén szabályozásában, ezért a továbbiakban csak a hiszton acetiláció génexpresszióra gyakorolt lehetséges hatásának vizsgálatára koncentráltam.

Számos tanulmány igazolja, hogy az aktívan átíródó gén szabályozó régióiban feldúsult az acetilált H3K9 szintje [116]. Nemrég Tóth és munkatársai drog-szenzitív és drog-rezisztens humán emlőkarcinóma sejtek vizsgálata során kimutatták, hogy a rezisztens sejtekben intenzíven átíródó *MDR1* gén promóter régiójában jelentősen megemelkedett az acetilált H3K9 mennyisége [75]. Ebből kiindulva elhatároztam, hogy kromatin immunprecipitáció segítségével megvizsgálom az *Abcb1* gén iniciátor régióiban a H3K9ac mennyiségét, feltárva ezáltal a sejtvonalak között megfigyelt transzkripciós aktivitások

különbségeinek egyik lehetséges kiváltó okát. Annak ellenére, hogy az *MDR1* gének expressziója jelentősen megemelkedett a drog-rezisztens sejtekben, meglepő módon egyik gén iniciátor régiójában sem sikerült jelentős különbséget kimutatni a H3K9ac mennyiségében a sejtvonalak között. Ebből arra következtethetünk, hogy a col500 és col1000 sejtekben a transzkripció aktivációja nem jár együtt a H3K9 acetiláció megemelkedésével. Az a megfigyelés, miszerint az *Abcb1a* iniciátor régiójában mindhárom sejtvonal esetén magasabb a H3K9ac mennyisége, mint az *1b* iniciátor régiójában, egybevág a róluk képződött mRNS-ek mennyiségével. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a H3K9 acetilációnak mindhárom sejtvonalban szerepe van az *Abcb1a* gén *Abcb1b*-hez képest fokozottabb transzkripciójában, azonban a sejtvonalak között detektált expresszió-különbségek létrehozásában nem vesz részt. A fentiek ismeretében azt egyértelműen kijelenteni nem lehet, hogy a hiszton acetilációnak nincs szerepe a drog-rezisztens sejtekben megfigyelt *Abcb1* aktivációban, hiszen könnyen elképzelhető, hogy annak hátterében más, általam nem vizsgált hiszton oldalláncok acetilációs szintjének megváltozása állhat.

A hiszton acetiláció *Abcb1* génexpresszióban betöltött szabályozó szerepét számos kutatócsoport vizsgálta, különböző drog-szenzitív és drog-rezisztens sejtek felhasználásával. Egy széles körben elfogadott modell szerint a DNS-metiláció és a hiszton fehérjék acetilációja között hierarchikus viszony áll fenn, melyben a metiláció domináns az acetiláció felett [76]. E modell alapján a három hepatoma sejtvonal esetén az *Abcb1* gének promóter régióinak metilációs foka alacsony kell, hogy legyen, hiszen mindegyik sejtvonal kifejezi a szóban forgó géneket. Ezért ha a sejteket hiszton deacetiláz inhibitorral kezelem, a várakozás szerint mindegyik sejtvonalban az *Abcb1* gének transzkripciójának aktivációját kell tapasztalnom, hiszen a metiláció nem szab gátat a HDACi kezelés hatására megemelkedett hiszton acetiláció közvetítette génaktivációnak. A fenti hipotézis tesztelésének érdekében a sejteket hiszton deacetiláz gátló TSA-val kezeltem. Első lépésben arra voltam kíváncsi, hogy a kezelés hatására a sejtekben valóban megemelkedik-e a globális hiszton acetiláció. Western-blot kísérlettel sikerült kimutatnom, hogy a trichostatin A jelentősen megnövelte az acetilált H3 és H4 fehérjék mennyiségét a kezeletlen mintákban detektált szinthez képest. Ezután az *Abcb1* gének iniciátor régióit vettem górcső alá, ahol arra voltam kíváncsi, hogy a TSA kezelés miként változtatja meg a H3K9 acetilációt. Kromatin immunoprecipitációval kimutattam, hogy a kezelés hatására mindhárom sejtvonalban az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének iniciátor régióiban a H3K9 acetiláció szintje a kezeletlen kontrol mintákhoz képest jelentősen megemelkedett. Ezek alapján elmondható, hogy a TSA kezelés elérte a célját, sikerült

megnövelnem a promóter régiók acetiláltságának intenzitását. Ha a kezdeti feltételezés-
miszerint az általam vizsgált sejtvonalakban az *Abcb1* gén expressziójának szabályozásában
a promóter régiók DNS-metilációja nem, csupán azok hiszton-acetilációja játszik szerepet-
helyes, akkor a TSA által előidézett változást a gén átírásának fokozódása kell, hogy
kövesse. Ennek ellenőrzésére a kezelt és kezeletlen sejtekből származó mintákon real time
PCR-t végeztem, és az eredmények kiértékelése során meglepő dolgot tapasztaltam. Az
Abcb1b esetén a TSA kezelés várt hatását sikerült kimutatnom: mindhárom sejtvonalban a
kezelt sejtekben megnőtt a génről képződött mRNA mennyisége a kezeletlen sejtekhez képest,
azonban az *Abcb1a* esetén teljesen váratlanul ennek épp az ellenkezőjét tapasztaltam, azaz a
kezelt sejtekben csökkent a génről képződött mRNA mennyisége. Amennyiben a TSA
valóban közvetlenül a gén transzkripcióját befolyásolta, akkor a fent látott különbségek a
pre-mRNA-ek vizsgálata során is felszínre kell, hogy jöjjenek. És valóban, az *Abcb1a* pre-
mRNA-ek mennyisége csökkent, míg az *Abcb1b* pre-mRNA-ek mennyisége nőtt a trichostatin
A-val kezelt sejtekben. Ez a megfigyelés tehát azt sugallja, hogy a HDACi-kezelés az általam
vizsgált sejtvonalakban eltérően hat az *MDR1* gén transzkripciójára: az *Abcb1a* átírását
csökkenti, ezzel párhuzamosan az *Abcb1b* transzkripcióját pedig fokozza. A szakirodalomban
számos olyan tanulmány megtalálható, melyekben a hiszton deacetiláz inhibitor kezelés
MDR1 expressziójára gyakorolt hatását vizsgálták, mind drog-szenzitív, mind drog-rezisztens
sejtekben. Jin és munkatársai drog-szenzitív humán vastagbél karcinóma sejtek
felhasználásával elsőként mutatták ki, hogy a TSA képes megemelni az *MDR1* expresszióját
[74]. Azonban arra, hogy rágszálókból származó rákos sejtvonalakban a HDACi kezelés
hatására ellentétesen válaszolt volna a két *Abcb1* gén, nem találunk példát. Hiszton deacetiláz
inhibitor kezelés ABCB1 génexpresszióra gyakorolt ellentétes hatását El-Khoury és kollégái
humán kissejtes tüdőkarcinóma sejtek drog-szenzitív, P-gp-negatív (H69WT) és rezisztens, P-
gp-pozitív (H69VP) változataiban írták le [104]. Míg az én esetemben a TSA kezelés a
sejtvonalakban azonos irányba mozdította el az *Abcb1* gén expresszióját (a szenzitív és a
rezisztens sejtekben az *Abcb1a* expresszióját csökkentette, az *Abcb1b* expresszióját növelte),
addig az ő eredményeik szerint a TSA kezelés hatására a sejtvonalak között mutatkozott
eltérés: a szenzitív sejtekben az ABCB1 expressziója jelentősen megemelkedett, azonban a
rezisztens sejtekben drasztikusan lecsökkent. A jelenség mögött megbúvó epigenetikai
változások után kutatva kimutatták, hogy a TSA kezelés hatására mindkét sejtvonalban
megemelkedett a globális H4ac szintje, hasonlóképp, mint az általam vizsgált sejtvonalakban
(az ő esetükben a szenzitív sejtekben ez a növekedés nagyobb mértékű volt, én nem
tapasztaltam ilyen különbséget a sejtvonalak között). A TSA kezelés hiszton acetilációra

gyakorolt hatását az ABCB1 promóter régiójában kromatin immunoprecipitációval vizsgálták. Az acetilált H3 esetében azt tapasztalták, hogy szenzitív sejtekben az idő múlásával egyre jobban emelkedett a H3 acetiláció, a rezisztens sejtekben viszont ez az emelkedés hamarabb lecsengett, és megközelítőleg visszatért a kiindulási értékhez. Azt, hogy ennek van-e szerepe MDR1 expresszió csökkenésében, és ha igen, akkor pontosan milyen, nem sikerült megmagyarázni. Ezzel szemben az acetilált H4 mennyisége mindkét sejtvonalban folyamatosan emelkedett, de a rezisztens sejtvonalban a növekedés mértéke alacsonyabb volt, amit a rezisztens sejtek magasabb kiindulási H4ac szintjével magyaráztak. Mivel én a TSA hatását a promóter régiók H3K9ac szintjére csak egy időpontban vizsgáltam, így annak változásának dinamikájáról nem áll rendelkezésre információ. Az eredményeim azt mutatják, hogy a vizsgált időpontban nem látható jelentős eltérés a sejtvonalak között egyik gén promóter régiójában sem, a trichostatin A kezelés után minden esetben megemelkedett a H3K9ac mennyisége. A gének promóter régióinak azonos H3K9ac mintázata ellenére azonban a transzkripciójuk ellentétes irányba változott: az *Abcb1a* expressziója csökkent, míg az *Abcb1b* expressziója nőtt. Bár ez elsőre meglepőnek tűnhet, annak tükrében, miszerint számos tanulmányban leírták, hogy a HDACi kezelés hatására bekövetkezett hiszton acetiláció növekedése egyes gének aktivációját, míg mások represszióját is okozhatja, nem is olyan váratlan eredmény [124, 125]. Azonban azt figyelembe véve, hogy ezekben a vizsgálatokban egymástól távol elhelyezkedő és más-más funkciót betöltő gének esetén írták le azok megemelkedett hiszton acetilációra adott ellentétes válaszát, ez a két egymáshoz közel elhelyezkedő és hasonló funkcióval rendelkező gén esetén érdekes megfigyelés. Mivel a hiszton acetiláz és deacetiláz enzimek a hisztonokon kívül nem-hiszton fehérjék- elsősorban transzkripciós faktorok- acetilációjáért és deacetilációjáért is felelősek [67], elképzelhető, hogy a HDACi kezelés *Abcb1* gének expressziójára gyakorolt eltérő hatása egy transzkripciós faktor acetiláltsági fokának megváltozásán keresztül jelentkezett. Amennyiben az *Abcb1a* gén transzkripciójában egy olyan represszor fehérje is szerepet játszik, mely acetilált formában aktív, könnyen elképzelhető, hogy a TSA kezelés hatására a sejtekben megemelkedett az acetilált faktor mennyisége, és ez, annak ellenére, hogy a gén promóter régiójában megnövekedett az acetilált hisztonok mennyisége, gátolta a génátírást.

Ahogy azt az előzőekben megállapítottam, a HDACi kezelés eltérően hatott az *Abcb1* gének expressziójára. Ez a megfigyelés felvetette a kérdést, hogy ez a különbség vajon a transzporterek aktivitásában is megjelenik-e? A kísérletet elvégezve azt tapasztaltam, hogy a

TSA kezelés érdemben nem befolyásolta a vizsgált pumpák aktivitását, az mRNS szintekben korábban látott különbségek nem fejeződtek ki a transzporterek aktivitásában.

Összefoglalásként elmondhatom, hogy a rákos sejtek szerzett multidrog rezisztens fenotípusának létrehozásában az ABCB transzporter megnövekedett aktivitása gyakran kulcsfontosságú szerepet játszik. Ezt számos faktor (génamplifikáció, promóter mutáció, mRNS-stabilitás, transzkripció aktiváció) bonyolult összjátéka határozza meg. Az eddigi kutatások eredményeiből úgy tűnik, ezen faktorok MDR kialakulásában való közreműködése függ a sejtípustól és a sejteket érő különböző hatásoktól is. Az általam vizsgált multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtekben a fokozott drog-kipumpáló képességért az ABCB1b transzporter fokozott működése tehető felelőssé, melynek kialakulásában elsősorban az őt kódoló gén fokozott transzkripciója játszik szerepet. A vele homológ *Abcb1a* gén transzkripciója szintén aktiválódott a drog-rezisztens sejtekben, ám a róla képződő ABCB1a transzporter ennek ellenére csökkent aktivitást mutat ezekben a sejtekben.

A klinikumban ígéretes rákellenes szerként nyilvántartott és alkalmazott hiszton deacetiláz inhibitor trichostatin A-ról kimutatták, hogy az a kezelt rákos sejteket az ABCB transzporterek aktivációján keresztül más kemoterápiás szerekkel szemben rezisztenssé tette. A sejtvonalakat TSA-val kezelve az *Abcb1* génnek promóter régiójában megemelkedett az acetilált hiszton fehérjék mennyisége, de ezt csak az *Abcb1b* esetén követte fokozott génátírás, azonban ez nem befolyásolta a róla képződő transzporter aktivitását.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Boros Imrének, amiért bekapcsolódhattam a tanszéken folyó kutatómunkába, és hogy az itt töltött évek alatt tanácsaival lelkiismeretesen irányította munkámat.

Hálával tartozom Dr. Nagy Enikőnek a közös munka során nyújtott elméleti és gyakorlati segítségéért, és hogy a felmerülő problémákkal mindig fordulhattam hozzá és számíthattam rá.

Köszönet illeti Pusztai Dávidot és Vedelek Balázst, akik szakdolgozóként részt vettek a kutatómunkában, és sok segítséget nyújtottak a luciferáz-mérések elvégzésében. Külön szeretném megköszönni Dr. Venetianer Anikónak, hogy nagylelkűen rendelkezésemre bocsájtotta a kísérletek során használt sejtvonalakat.

Hálás köszönet Ökrösné „Kis Katinak” az SZBK laboratóriumában végzett kísérleteimhez nyújtott önzetlen segítségéért, amiről csak szuperlatívuszokban lehet beszélni.

Köszönöm Dr. Újfaludi Zsuzsannának azt a rengeteg segítséget és türelmet, amivel szakdolgozó koromban az önálló kutatómunkára tanított.

Köszönöm a lehetőséget Prof. Dr. Zeki Topcu-nak, hogy bekapcsolódhattam az Ada3 projectbe, és hogy laboratóriumában mindig barátsággal fogadott.

Külön köszönöm a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék összes jelenlegi és volt munkatársának a baráti légkört és a munkám során nyújtott segítségüket.

Hálás vagyok szüleimnek és a családomnak, akik mindig mindenben támogattak, nélkülük nem juthattam volna el idáig. Köszönöm Petrának, hogy mellettem állt és támogatott.

ÖSSZEFOGLALÓ

A WHO adatai szerint 2008-ban világszerte 7.6 millió ember esett áldozatul valamilyen rákos megbetegedésnek, a becslések alapján ez a szám 2030-ra elérheti a 13.1 milliót. A daganatos betegségek továbbá jelentős anyagi kiadásokkal is járnak, ezek 2008-ban a világ GDP-jének 1.5 %-át, 895 milliárd USA dollárt emésztettek fel. Magyarországon még rosszabb volt a helyzet: az ország GDP-jének 3.05 %-át költötte a rákos megbetegedések okozta közvetlen költségekre a 2008-as esztendőben.

A fenti tények ismeretében kijelenthető, hogy a rákos megbetegedések esetleges megelőzése, kezelése és gyógyítása az emberiség egyik igen aktuális problémája, mely azonban óriási kihívást is jelent a kutatók és orvosok számára.

A daganatos megbetegedések kezelésére három fő stratégiát alkalmaznak az orvostudományban: sebészi beavatkozást, sugárterápiát valamint gyógyszeres kezelést (kemoterápia). A kemoterápiás kezelés során alkalmazott gyógyszerek (citotoxikumok) a daganatsejtek osztódásának gátlását, azok elpusztítását célozzák. A citotoxikus szerek relatíve széles hatásspektruma miatt a kemoterápiás kezelés durva és nem-specifikus beavatkozásnak számít, amit csupán rövid ideig képes tolerálni a szervezet. Mivel ezek a szerek kifejezetten a gyorsan osztódó sejtek (a ráksejtek ilyenek) pusztulását okozzák, a tumorsejtek mellett a gyorsan osztódó egészséges sejteket is károsíthatják, ezáltal igen súlyos mellékhatásokat okozhatnak. Mivel a kezelés előnyei még így is jelentősebbek az azt kísérő mellékhatásoknál, ezért a gyógyszeres terápia az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a rák elleni küzdelemben, bár ez inkább egy jobb és hatékonyabb alternatíva hiányát, mintsem a kemoterápia hatékonyságát tükrözi. A sikeres rákterápia kulcsa az alkalmazott kemoterápiás szerek hatékonysága akár egyedül akár sugárterápiával vagy sebészeti eljárással kombinálva. A daganatos betegek kemoterápiás kezelése azonban gyakran kudarcba fullad, aminek fő oka a tumorok citotoxikus szerekkel szemben mutatott úgynevezett multidrog rezisztencia fenotípusa. Úgy tartják, hogy a sikertelen kemoterápiás kezelések 90%-a a MDR-val hozható kapcsolatba. Megfigyelték, hogy egyes esetekben a tumor egyáltalán nem reagált az alkalmazott kezelésre, tehát már a kemoterápiás szerrel való találkozás előtt drog-rezisztensnek tekinthető, ezt nevezzük elsődleges vagy természetes multidrog rezisztenciának. Más esetekben a kemoterápiás kezelésre kezdetben jól reagáló, a citotoxikus anyagra érzékeny daganat később ellenállóvá vált a terápia során alkalmazott gyógyszerrel szemben,

ily módon okozva a kemoterápia kudarcát, ez a jelenség a szerzett multidrog rezisztencia. Tovább súlyosbítja a helyzetet az a tény, hogy sok esetben a tumor nem csak az eredeti droggal szemben, hanem több más, szerkezetükben és hatásmechanizmusukban különböző kemoterápiás szerrel szemben is keresztrezisztenciát mutathat. A szerzett multidrog rezisztencia kialakulásáért számos sejtes mechanizmus tehető felelőssé. Ezeket két fő kategóriába lehet besorolni: az ún. nem-klasszikus illetve a transzport-alapú klasszikus mechanizmusok. A szerzett multidrog rezisztencia klasszikus, transzport alapú kialakulása során a kemoterápiás szereket különböző, energia-függő membrán transzporter fehérjék távolítják el a rákos sejtből, biztosítva ezáltal, hogy a drogok nem érik el a terápiás koncentrációjukat a sejten belül. Ezek a pumpák az ABC-transzporter (**A**TP-**B**inding **C**assette) fehérje szupercsalád tagjai, melyek evolúciósan rendkívül konzerváltak, a prokariótáktól egészen az emberig megtalálhatóak. Fiziológias szerepük többek között a sejtekbe bejutott különböző mérgeanyagok gyors és hatékony eltávolítása, ezáltal a sejt túlélésének biztosítása. Groteszk módon a rákos sejtek ezt a természetes védekező mechanizmust kihasználva, azt a maguk javára fordítva biztosítják saját túlélésüket. Ezért a jelenségért elsősorban az ABC transzporter családba tartozó ABCB1/MDR1/P-gp fehérje fokozott aktivitása tehető felelőssé. A megnövekedett ABCB1 aktivitást számos mechanizmus előidézheti. A drog-rezisztens sejtekben génamplifikáció, kromoszóma-transzlokáció és mRNS-stabilizáció gyakran közreműködik a megemelkedett ABCB1 szint létrehozásában. Ezen faktorok mellett fontos szerepet játszanak az ABCB1 gén transzkripciójának aktivitásában bekövetkezett változások is. Az MDR1 génkifejeződését számos transzkripciós faktor, tumor szuppresszor és onkogén szabályozza, valamint egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az epigenetikai faktorok (hiszton acetiláció, DNS metiláció) szabályozó szerepének is.

Munkám során multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtvonalakat használtam a MDR fenotípus kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok, különös tekintettel a hiszton acetiláció szerepének a felderítésére. A közepesen (col500) és az erősen (col1000) multidrog rezisztens sejtvonalakat a dexametazon-rezisztens anyai sejtvonal (D12) növekvő koncentrációjú kolhicinnel való kezelése során szelektálták. Az így létrejött col500 és col100 sejtek keresztrezisztenciát mutattak számos, szerkezetileg különböző droggal szemben. Kimutatták, hogy az anyai sejtvonalhoz képest jelentősen megemelkedett bennük az MDR1 mRNS és fehérje szintje, valamint leírták, hogy a jelenség hátterében nem génamplifikáció áll.

A dolgozatom elején felvázolt kérdéseket és az azok megválaszolására irányuló kísérleteimet az alábbiakban foglalom össze.

1. Első lépésben a sejtvonalak transzporter aktivitását határoztam meg. Ennek során alátámasztottam a korábbi eredményeket, miszerint a rezisztens sejtekben az ABCB1 transzporter aktivitása jelentősen megemelkedett. Meglepő módon az ABCC1 transzporter aktivitása azonban ezzel ellentétesen változott: a szenzitív sejtekben aktívabb pumpa a rezisztens sejtekben szinte inaktiválódott. Mivel a rágcsálók genomja két ABCB1 transzporter izoformát kódol, és a korábbi vizsgálatok során a szegedi kutatók nem különítették el ezek működését a sejtvonalakban, ezért következő lépésben meghatároztam az ABCB1 transzporterek aktivitását. A kapott eredmények alapján a két izoforma aktivitási mintázata között jelentős különbség fedezhető fel. A D12 sejtekben mért ABCB1a aktivitás kb. fele az ABCB1b esetén mért értéknek, a rezisztens sejtekben ez az alacsony aktivitás még tovább csökken, míg ezzel párhuzamosan a magasabb aktivitást mutató 1b izoforma aktivitása tovább nő a col500 és col1000 sejtekben. A fenti eredmények alapján kijelenthető, hogy **a vizsgált rezisztens sejtek MDR-fenotípusa az ABCB1b transzporter fokozott működésének köszönhető.**

2. Az aktivitás-vizsgálatok során felfedezett különbségeket látva megfogalmazódott a kérdés, miszerint az *Abcb1* gén expressziójában történtek-e olyan változások, melyek megmagyarázhatják a fent leírt megfigyeléseket. Real time PCR segítségével mindegyik sejtvonalban jelentősen magasabb *Abcb1a* mRNS szintet detektáltam, mint *Abcb1b*-t. A rezisztens sejtekben a szenzitív sejtekhez képest mindkét mRNS mennyisége megnőtt, azonban az *Abcb1b* esetén a lépték jóval magasabb volt, mint az *Abcb1a* esetén. Annak érdekében, hogy megvizsgáljam, vajon az mRNS-szinten feltárt különbségek fehérjeszinten is megjelennek-e, ABCB1a és ABCB1b specifikus ellenanyagok felhasználásával Western blot kísérletet végeztem. Ennek során megállapítottam, hogy az ABCB1b fehérje mennyisége a drog-rezisztens sejtvonalakban kis mértékben megemelkedett a szenzitív sejtekben detektált mennyiséghez képest, míg az ABCB1a esetén számottevő eltérést nem sikerült kimutatnom. A Western blot eredményei tehát alátámasztják a real time PCR kísérletekből nyert adatot: **az *Abcb1b* expressziója mind mRNS mind fehérjeszinten megemelkedett a drog-rezisztens sejtekben, ami magyarázatot adhat a transzporter magas aktivitására.**

3. Drog-rezisztens sejtekben a megemelkedett *Abcb1* mRNS szint létrehozásában több faktor is szerepet játszhat. Ezek közül gyakran megfigyelték a transzportereket kódoló gén amplifikációját. Mindkét gén kópiaszámában csupán minimális (kevesebb, mint kétszeres)

eltéréseket fedeztem fel a D12 és a rezisztens sejtek között. **A col500 és col1000 sejtekben kimutatott magas mRNS-szintet a bennük feltételezett kismértékű génamplifikáció egyedül aligha magyarázza.** Ezért felmerült a kérdés, hogy vajon az *Abcb1* mRNS-ek stabilitásának megnövekedése szerepet játszik-e a megemelkedett mRNS-szint létrehozásában? Azt tapasztaltam, hogy míg az *Abcb1a* mRNS-ek esetén nem mutatható ki jelentős különbség azok fél-életidejében a szenzitív és a rezisztens sejtek között, addig **az *Abcb1b* mRNS-ek fél-életideje kismértékben ugyan, de megnövekedett a col500 és col1000 sejtekben.** Azonban ez a növekedés közel sem annyira jelentős, hogy az magyarázatot adhatna a sejtvonalak között detektált 5-20-szoros nagyságrendű mRNS-mennyiségbeli különbségekre.

4. Mivel sem a génamplifikáció, sem az RNS-stabilitás vizsgálatából származó eredmények nem szolgáltak teljes magyarázattal a megnövekedett mRNS-mennyiség kialakulására, ezért következő lépésben az *Abcb1* gén transzkripcióját vettem górcső alá. A génekről képződő éretlen (pre-) mRNS-ek vizsgálata során sikerült kimutatnom, hogy a rezisztens sejtekben mind a pre-*Abcb1a*, mind a pre-*Abcb1b* mRNS nagyobb mennyiségben van jelen, mint a szenzitív sejtvonalban. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy **a drog-rezisztens sejtekben az *Abcb1* gén transzkripciója fokozottabb, mint a szenzitív sejtekben,** és ez magyarázattal szolgálhat a col500 és col1000 sejtekben kimutatott szignifikánsan magasabb mRNS-szintek kialakulására is.

5. Az *Abcb1* transzkripciójának szabályozása igen összetett, melyet számos, a promóter régió konszenzus cisz-elemeihez kötődő transz-aktiváló fehérje bonyolult összjátéka határoz meg. Az *MDR1* fokozott transzkripciójának egyik lehetséges kiváltó oka a gén szabályozó régiójában bekövetkezett mutáció(k) jelenléte. A promóter régiók összehasonlítása során nem találtam eltéréseket a három sejtvonal vizsgált szekvenciái között, ami arra utal, hogy **a gének fokozott átírásának hátterében ez esetben nem a gének szabályozó régióinak mutációja áll.** A következő lépésben arra voltam kíváncsi, hogy a sejtvonalakban történt-e valamilyen változás a gén transzkripcióját szabályozó faktorok tekintetében. Az eredményeim alapján elmondhatom, hogy **azok a transzkripciós faktorok, melyek az *Abcb1* gén expressziójára gyakorolt hatásukat a promóter régiók általam vizsgált szakaszain belül lévő kötőhelyeiken keresztül fejtik ki, sem mennyiségükben, sem aktivitásukban nem különböznek a szenzitív és a rezisztens sejtek között.**

6. Az *Abcb1* expresszióját szabályozó transzkripciós faktorok kötőhelyeikhez való hozzáférését a kromatinszerkezet befolyásolja. Az epigenetikai tényezők közül a DNS-metiláció és a hiszton acetiláció az *Abcb1* gén szabályozásában betöltött szerepét évek óta

kitüntetett figyelemmel követik nyomon. Drog-szenzitív és drog-rezisztens humán emlőkarcinóma sejtek vizsgálata során kimutatták, hogy a rezisztens sejtekben intenzíven átíródó *MDR1* gén promóter régiójában jelentősen megemelkedett az acetilált H3K9 mennyisége. Annak ellenére, hogy az *MDR1* gének expressziója jelentősen megemelkedett a drog-rezisztens sejtekben, meglepő módon egyik gén iniciátor régiójában sem sikerült jelentős különbséget kimutatnom a H3K9ac mennyiségében a sejtvonalak között. Ebből arra következtethetünk, hogy a col500 és col1000 sejtekben az *Abcb1* gének transzkripció aktivációja nem jár együtt a H3K9 acetiláció megemelkedésével. Az a megfigyelés, miszerint az *Abcb1a* iniciátor régiójában mindhárom sejtvonal esetén magasabb a H3K9ac mennyisége, mint az *1b* iniciátor régiójában, egybevág a róluk képződött mRNS-ek mennyiségével. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy **a H3K9 acetilációnak mindhárom sejtvonalban szerepe van az *Abcb1a* gén *Abcb1b*-hez képest fokozottabb transzkripciójában, azonban a sejtvonalak között detektált expresszió-különbségek létrehozásában nem vesz részt.**

7. A hiszton acetiláció *Abcb1* génexpresszióban betöltött szabályozó szerepét számos kutatócsoport vizsgálta, különböző drog-szenzitív és drog-rezisztens sejtek felhasználásával. Egy széles körben elfogadott modell szerint a DNS-metiláció és a hiszton fehérjék acetilációja között hierarchikus viszony áll fenn, melyben a metiláció domináns az acetiláció felett. E modell alapján a három hepatoma sejtvonal esetén az *Abcb1* gének promóter régióinak metilációs foka alacsony kell, hogy legyen, hiszen mindegyik sejtvonal kifejezi a szóban forgó géneket. Ezért ha a sejteket hiszton deacetiláz inhibitorral kezelem, a várakozás szerint mindegyik sejtvonalban az *Abcb1* gének transzkripciójának aktivációját kell tapasztalnom, hiszen a metiláció nem szab gátat a HDACi kezelés hatására megemelkedett hiszton acetiláció közvetítette génaktivációnak. A fenti hipotézis tesztelésének érdekében a sejteket hiszton deacetiláz gátló TSA-val kezeltem. Az *Abcb1b* esetén a TSA kezelés várt hatását sikerült kimutatnom: mindhárom sejtvonalban a kezelt sejtekben megnőtt a génről képződött mRNS mennyisége a kezeletlen sejtekhez képest, azonban az *Abcb1a* esetén teljesen váratlanul ennek épp az ellenkezőjét tapasztaltam, azaz a kezelt sejtekben csökkent a génről képződött mRNS mennyisége. Amennyiben a TSA valóban közvetlenül a gének transzkripcióját befolyásolta, akkor a fent látott különbségek a pre-mRNS-ek vizsgálata során is felszínre kell, hogy jöjjenek. És valóban, az *Abcb1a* pre-mRNS-ek mennyisége csökkent, míg az *Abcb1b* pre-mRNS-ek mennyisége nőtt a trichostatin A-val kezelt sejtekben. Ez a megfigyelés tehát azt sugallja, hogy **a HDACi-kezelés az általam vizsgált sejtvonalakban eltérően hat az *MDR1* gének transzkripciójára: az *Abcb1a* átírását csökkenti, ezzel párhuzamosan az *Abcb1b* transzkripcióját pedig fokozza.**

SUMMARY

According to the WHO, there were 7.6 million deaths worldwide from cancer in 2008, and it is expected that it will reach 13.1 million in 2030. Furthermore, the total economic impact of premature death and disability from cancer globally was 895 billion USD in 2008, which represents 1.5 % of the world's GDP. In Hungary, the situation was even worse: 3.05 % of the country's GDP were spent for the direct medical costs related to cancer treatment in 2008.

In the light of the above facts, the prevention, treatment and healing of cancer is one of the most important issue of the humanity, which also provides a huge challenge for researchers and medical doctors as well.

Three major strategies are used to treat cancer: surgery, radiotherapy and special pharmacotherapy (chemotherapy). Specific drugs (cytotoxic agents) are used in chemotherapeutic treatments which kill the cancer cells by inhibiting their multiplication. Because of the relative broad spectrum of the cytotoxic agents, however, chemotherapy is a harsh and unspecific treatment, which can be tolerated only for short periods by the human body. Since cytotoxic compounds kill rapidly dividing cells (like cancer cells), they can harm the healthy cells dividing for tissue renewal as well, which cause serious side effects. Despite that as the benefits of the treatment are more significant than the side effects, chemotherapy is the most frequently used method to fight against cancer, though this fact reflects more a lack of a better and more efficient option, than the effectiveness of the chemotherapy. The key factor in the successful chemotherapy is the effectiveness of the applied drug, alone or in combination with radiotherapy or surgery. Often one of the main reasons of failure of chemotherapeutic treatment of a patients is the so called multidrug resistant phenotype of the tumors. MDR is believed to cause treatment failure in the case of over 90 % of patients with metastatic cancer. In some cases, the tumor does not respond to the treatment at all, such as it is drug resistant before the drug treatment. This phenomenon is called as intrinsic, or natural drug resistance. In other cases, tumors which show sensitivity at the start of chemotherapy and respond well to drugs developed resistance against the chemotherapeutic compounds during the course of the treatment. This is referred to as acquired drug resistance. Furthermore, in the process of developing acquired resistance, tumors may become cross-resistant to a range of chemotherapeutic agents with different structures and mechanisms of

action by this reaching a stage of acquired multidrug resistance (MDR). A number of cellular mechanisms have been described to explain the phenomenon of acquired MDR. These have been classified into two major groups: non-classical and transport-based classical mechanisms. The classical multidrug-resistant phenotype of tumor cells is acquired via an increased capability of drug efflux by energy-dependent transmembrane transporters. The transporters involved are members of the ABC (ATP-Binding Cassette) protein superfamily, which are present in all kingdoms of life from prokaryotes to mammals. The major physiological function of ABC transporters is to extrude xenobiotics from the cytoplasm, thereby helping the survival of the cell. Grotesquely, cancer cells take advantage of this natural protection mechanism thereby ensuring their own survival. For this phenomenon, the increased activity level of the ABC family member ABCB1/MDR1/P-gp protein is responsible. To reach an increased ABCB1 activity level a number of different mechanisms have been described. In drug resistant cell lines, gene amplification, chromosomal translocation and mRNA-stabilization can contribute to elevated ABCB1 protein levels. On the other hand, changes in the transcription activation of the ABCB1 gene also play an important role in this process: several transcription factors, tumor suppressors, oncogenes and epigenetic factors and modifications (histone acetylation, DNA methylation) influence the transcription of the gene.

I used multidrug resistant rat hepatoma cell lines to explore the molecular mechanisms underlying MDR, in particular, I was interested to determine the role of histone acetylation in the development of multidrug resistant phenotype. In my experiments I used multidrug resistant cell lines which showed medium (col500) and high (col1000) level resistancy. These cell lines were selected from a dexamethasone-resistant hepatoma clone 2 (D12) by increasing the concentrations of colchicine. Previous studies have demonstrated that although these cells contain no multiplied MDR gene copies, they overexpress *Abcb1* mRNAs and display resistancy to structurally unrelated drugs.

The questions I intended to answer by my thesis work and the summary of results I have collected are as summarized below.

1. At first, I characterized the transporter activities of the studied cell lines. I found that the activity of the ABCB1 transporter is significantly higher in the drug resistant cells as compared to the sensitive D12 parental cell line. This result is in accord with the observations of those who established the cell lines. Surprisingly, drug selection did not increase but rather

decreased the activity of the ABCC1 transporter: in drug sensitive D12 cells a higher activity of this transporter was detectable as in the resistant cell lines, in which this transporter was nearly inactivated. In rodent genomes, there are two genes encoding homologues of the major human drug transporter ABCB1. The contributions to drug resistency in the cell lines I used of the two transporters encoded by these genes were not distinguished previously, therefore I found it important to compare their activities. I found that the activity of ABCB1a was decreased in the drug resistant col500 and col1000 cells as compared to the drug sensitive D12 cell line. In contrast, the activity of ABCB1b was increased in both drug-resistant cell lines as compared to the sensitive cell line. In summary, based on these data I concluded that **the ABCB1b transporter has the major contribution to the MDR phenotype of the studied drug-resistant rat hepatoma cells.**

2. Since high drug efflux activity may result from several mechanisms affecting *Abcb1* gene expression and/or ABCB1 activity, next I compared the mRNA levels of *Abcb1a* and *Abcb1b* by quantitative RT-PCR. I found that *Abcb1a* and *Abcb1b* mRNA levels differed significantly in the parental D12 cell line, being the level of *Abcb1a*-specific mRNA nearly thirty-fold higher than that of *Abcb1b*. In the drug-resistant col500 and col1000 cell lines, increased mRNA levels suggested that both genes were upregulated. Curiously, while the mRNA level of *Abcb1a* was higher than that of *Abcb1b* both in the parental and the resistant cell lines, the increase of *Abcb1b* expression in drug-resistant versus parental cells was considerably higher than that of *Abcb1a*. Determination of ABCB1 transporter protein levels by Western blot confirmed that the resistant cell lines had slightly higher ABCB1b amount compared to the sensitive D12 cells, while the expression level of ABCB1a differed only very modestly between sensitive and resistant cells. This observation is in accord with the results of mRNA level determination. In short, **the increase in the expression level of *Abcb1b* in drug-resistant cells compared to the observed increase in the expression level of this gene in the parental cells is considerably higher than that of *Abcb1a* concerning both mRNA and protein levels. These data are in accord and provide explanation for the detected higher activity of this transporter, as described above.**

3. Many factors may contribute to the elevated *Abcb1* mRNA levels in drug resistant cell lines. Among these, one possible reason for *Abcb1* overexpression can be gene amplification. However, I observed only small fluctuations in the quantity of the *Abcb1* genomic regions (this did not reach a two-fold difference) between D12 and the resistant cell lines. **Therefore, I concluded that gene amplification alone is an unlikely cause of *Abcb1* overexpression in**

the studied rat hepatoma cell lines, as the differences in mRNA levels were much higher than one would expect based on the observed small differences in copy numbers. Another possibility of increased *Abcb1* mRNA levels could be stabilization of *Abcb1* mRNAs in the drug-resistant cell lines. This, however also not a reason for the drug resistancy since I detected only very modest differences in the decay of *Abcb1a* mRNA between drug-sensitive and resistant cell lines. On the other hand, ***Abcb1b* transcript levels in actinomycin D-treated col500 and col1000 cells were higher than in the parental D12 cell line at almost each time point tested. However, the increases of mRNA half-lives in the drug-resistant cells cannot serve as an explanation for the 5-20 times higher mRNA levels detected in these cells.**

4. Since data from neither gene amplification nor mRNA-stability experiments could explain the elevated mRNA-levels, next I compared the transcription rate of *Abcb1* genes. For this I compared the levels of unprocessed *Abcb1a* and *Abcb1b* pre-mRNAs. I detected elevated pre-*Abcb1a* and pre-*Abcb1b* levels in col500 and col1000 cell lines compared to the parental D12 cells. These data therefore suggest that ***Abcb1* genes are transcriptionally up-regulated in drug-resistant cells. This could serve as the main contribution to the elevated mRNA-levels in these cells.**

5. Regulation of the expression of the major human drug transporter gene *Abcb1* is highly complex, involving several trans-activator proteins binding to regulatory cis-elements in the promoter region. One possible reason for the elevated *MDR1* transcription can be mutation(s) in the regulatory region. However, **promoter mutation(s) cannot explain the elevated transcription in these cells** since by sequencing the regulatory regions I found no differences between the MDR promoter sequences of the three cell lines. Next, I focused on possible changes of the regulatory proteins which might affect the transcription of the *Abcb1* genes in the cell lines. Based on my results, **there are no differences between the sensitive and the resistant cell lines in the activity/amount of transcription factors that are known regulators of *Abcb1* expression through the examined fragments of the promoter regions.**

6. For transcription factors regulating *Abcb1* expression it is critical to gain access to their binding sites, which is highly affected by the chromatin structure. In recent years, the roles of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of *Abcb1* gene expression have been intensively studied. Using drug-sensitive and drug-resistant human breast carcinoma cells, it has been shown that the level of acetylated H3K9 was increased in the promoter region of the intensively transcribed *MDR1* gene in drug resistant cells compare to

sensitive ones. Despite the fact that *MDR1* gene expression was considerably higher in resistant cells, surprisingly I found that the acetylated H3K9 levels in the initiator regions of both *Abcb1* genes were similar in the sensitive and resistant cell lines. This suggests that an increased level of acetylated H3K9 at the promoter is not associated with *Abcb1* up-regulation in the col500 and col1000 cells. The level of acetylated H3K9 was higher in the *Abcb1a* initiator region than in the initiator region of *Abcb1b*. This observation correlates well with the amount of the mRNAs transcribed from the genes. These results might suggest that **H3K9 acetylation is important for the up-regulation of *Abcb1a* relative to *Abcb1b* in all cell lines, but the H3K9ac levels do not correlate with the expression levels of the *Abcb1* genes in the different cell lines.**

7. Several research groups investigated the role of histone acetylation in the regulation of *Abcb1* gene expression using various drug-sensitive and drug-resistant cell lines. There is a widely accepted model, which states that there is a hierarchical relationship between DNA methylation and histone acetylation, being methylation is dominant over acetylation. According to this model, the methylation status of the *Abcb1* genes has to be low in the studied three hepatoma cell lines, because all of them express these genes. Consequently, histone deacetylase inhibitor treatments should cause transcription activation of both genes in all these cell lines, as methylation will not interfere with the gene activation resulted from elevated histone acetylation upon HDACi treatment. To test this hypothesis, I treated the cells with trichostatin A, a well-known HDACi. In the case of *Abcb1b*, I detected the expected affect of the TSA-treatment: the mRNA level was considerably higher in the treated cells compared to the untreated ones in all cell lines. On the contrary, the mRNA level of *Abcb1a* was unexpectedly lower in the treated cells. A comparison of *Abcb1* pre-mRNA levels in TSA-treated versus untreated D12 parental and col500 and col1000 drug-resistant cells indicated similar changes in *Abcb1* expression upon TSA treatment, demonstrating that the **histone deacetylase inhibitor affected the transcription of the two *Abcb1* genes differently: it decreased the expression of *Abcb1a* and in parallel it increased the expression of *Abcb1b*. I observed this different behavior of the two *MDR* genes in response to HDAC inhibition in the parental and the drug-resistant cell lines as well.**

IRODALOMJEGYZÉK

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. 61(2): p. 69-90.
2. Zhukov, N.V. and S.A. Tjulandin, *Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory*. Biochemistry (Mosc), 2008. 73(5): p. 605-18.
3. Waldmann, T.A., *Immunotherapy: past, present and future*. Nat Med, 2003. 9(3): p. 269-77.
4. Pronzato, P. and M. Rondini, *Hormonotherapy of advanced prostate cancer*. Ann Oncol, 2005. 16 Suppl 4: p. iv80-84.
5. Jones, K.L. and A.U. Buzdar, *A review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2004. 11(3): p. 391-406.
6. El-Kenawi, A.E. and A.B. El-Remessy, *Angiogenesis Inhibitors in Cancer Therapy: Mechanistic perspective on classification and treatment rationales*. Br J Pharmacol, 2013.
7. Greenspan, E.M., et al., *Response of advanced breast carcinoma to the combination of the antimetabolite, Methotrexate, and the alkylating agent, thio-TEPA*. J Mt Sinai Hosp N Y, 1963. 30: p. 246-67.
8. DeVita, V.T., Jr. and E. Chu, *A history of cancer chemotherapy*. Cancer Research, 2008. 68(21): p. 8643-53.
9. Love, R.R., et al., *Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy*. Cancer, 1989. 63(3): p. 604-12.
10. Gottesman, M.M., *How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture*. Cancer Research, 1993. 53(4): p. 747-54.
11. Longley, D.B. and P.G. Johnston, *Molecular mechanisms of drug resistance*. J Pathol, 2005. 205(2): p. 275-92.
12. Gottesman, M.M. and I. Pastan, *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. Annu Rev Biochem, 1993. 62: p. 385-427.
13. Ullah, M.F., *Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy*. Asian Pac J Cancer Prev, 2008. 9(1): p. 1-6.
14. Mellor, H.R. and R. Callaghan, *Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response*. Pharmacology, 2008. 81(4): p. 275-300.
15. Gottesman, M.M., *Mechanisms of cancer drug resistance*. Annu Rev Med, 2002. 53: p. 615-27.
16. Ejendal, K.F. and C.A. Hrycyna, *Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2*. Curr Protein Pept Sci, 2002. 3(5): p. 503-11.
17. Kerbel, R.S., H. Kobayashi, and C.H. Graham, *Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes?* J Cell Biochem, 1994. 56(1): p. 37-47.
18. Gamcsik, M.P., G.R. Dubay, and B.R. Cox, *Increased rate of glutathione synthesis from cystine in drug-resistant MCF-7 cells*. Biochem Pharmacol, 2002. 63(5): p. 843-51.
19. Sugimoto, Y., et al., *Decreased expression of DNA topoisomerase I in camptothecin-resistant tumor cell lines as determined by a monoclonal antibody*. Cancer Research, 1990. 50(21): p. 6925-30.
20. Miyashita, T. and J.C. Reed, *bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by*

- glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. Cancer Research*, 1992. 52(19): p. 5407-11.
21. Krishna, R. and L.D. Mayer, *Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. Eur J Pharm Sci*, 2000. 11(4): p. 265-83.
 22. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol*, 1992. 8: p. 67-113.
 23. Sarkadi, B., et al., *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. Physiol Rev*, 2006. 86(4): p. 1179-236.
 24. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Res*, 2001. 11(7): p. 1156-66.
 25. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta*, 1976. 455(1): p. 152-62.
 26. Ueda, K., et al., *The mdrl gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. Biochem Biophys Res Commun*, 1986. 141(3): p. 956-62.
 27. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein multidrug transporter. Essays Biochem*, 2011. 50(1): p. 161-78.
 28. Hyde, S.C., et al., *Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature*, 1990. 346(6282): p. 362-5.
 29. Rees, D.C., E. Johnson, and O. Lewinson, *ABC transporters: the power to change. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(3): p. 218-27.
 30. Seeger, M.A. and H.W. van Veen, *Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2009. 1794(5): p. 725-737.
 31. Locher, K.P., *Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009. 364(1514): p. 239-45.
 32. Kruh, G.D. and M.G. Belinsky, *The MRP family of drug efflux pumps. Oncogene*, 2003. 22(47): p. 7537-52.
 33. Linton, K.J., *Structure and function of ABC transporters. Physiology (Bethesda)*, 2007. 22: p. 122-30.
 34. Higgins, C.F. and K.J. Linton, *The ATP switch model for ABC transporters. Nat Struct Mol Biol*, 2004. 11(10): p. 918-26.
 35. Sauna, Z.E. and S.V. Ambudkar, *Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. J Biol Chem*, 2001. 276(15): p. 11653-61.
 36. Jones, P.M. and A.M. George, *Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer: evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle. Proteins*, 2009. 75(2): p. 387-96.
 37. Higgins, C.F. and M.M. Gottesman, *Is the multidrug transporter a flippase? Trends Biochem Sci*, 1992. 17(1): p. 18-21.
 38. Aller, S.G., et al., *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. Science*, 2009. 323(5922): p. 1718-22.
 39. Cordon-Cardo, C., et al., *Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. J Histochem Cytochem*, 1990. 38(9): p. 1277-87.

40. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(21): p. 7735-8.
41. Chaudhary, P.M. and I.B. Roninson, *Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells*. Cell, 1991. 66(1): p. 85-94.
42. Fromm, M.F., *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends Pharmacol Sci, 2004. 25(8): p. 423-9.
43. Fojo, A.T., et al., *Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(1): p. 265-9.
44. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(1): p. 48-58.
45. Leonard, G.D., T. Fojo, and S.E. Bates, *The role of ABC transporters in clinical practice*. Oncologist, 2003. 8(5): p. 411-24.
46. Goldie, J.H. and A.J. Coldman, *The genetic origin of drug resistance in neoplasms: implications for systemic therapy*. Cancer Research, 1984. 44(9): p. 3643-53.
47. Abolhoda, A., et al., *Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin*. Clin Cancer Res, 1999. 5(11): p. 3352-6.
48. Yague, E., et al., *P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation*. J Biol Chem, 2003. 278(12): p. 10344-52.
49. Ueda, K., et al., *The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation*. J Biol Chem, 1987. 262(2): p. 505-8.
50. Chin, J.E., et al., *Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family*. Mol Cell Biol, 1989. 9(9): p. 3808-20.
51. Raguz, S., et al., *Production of P-glycoprotein from the MDR1 upstream promoter is insufficient to affect the response to first-line chemotherapy in advanced breast cancer*. Int J Cancer, 2008. 122(5): p. 1058-67.
52. van Groenigen, M., L.J. Valentijn, and F. Baas, *Identification of a functional initiator sequence in the human MDR1 promoter*. Biochim Biophys Acta, 1993. 1172(1-2): p. 138-46.
53. Goldsmith, M.E., et al., *A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene*. J Biol Chem, 1993. 268(8): p. 5856-60.
54. Hu, Z., S. Jin, and K.W. Scotto, *Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1*. J Biol Chem, 2000. 275(4): p. 2979-85.
55. Shen, H.L., et al., *Upregulation of mdr1 gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma*. Experimental Hematology, 2011. 39(5): p. 558-569.
56. Cornwell, M.M. and D.E. Smith, *SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity*. J Biol Chem, 1993. 268(26): p. 19505-11.
57. Labialle, S., et al., *New invMED1 element cis-activates human multidrug-related MDR1 and MVP genes, involving the LRP130 protein*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(13): p. 3864-76.
58. Johnson, R.A., T.A. Ince, and K.W. Scotto, *Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element*. J Biol Chem, 2001. 276(29): p. 27716-20.

59. Xia, Y., et al., *Differential regulation of c-Jun plays an instrumental role in chemoresistance of cancer cells*. J Biol Chem, 2013.
60. Vilaboa, N.E., et al., *Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1)*. J Biol Chem, 2000. 275(32): p. 24970-6.
61. Comerford, K.M., et al., *Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene*. Cancer Research, 2002. 62(12): p. 3387-94.
62. Geick, A., M. Eichelbaum, and O. Burk, *Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin*. J Biol Chem, 2001. 276(18): p. 14581-7.
63. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2010. 31(1): p. 27-36.
64. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. 389(6648): p. 251-60.
65. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. 128(4): p. 693-705.
66. Hebbes, T.R., A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson, *A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin*. EMBO J, 1988. 7(5): p. 1395-402.
67. Glozak, M.A., et al., *Acetylation and deacetylation of non-histone proteins*. Gene, 2005. 363: p. 15-23.
68. Desiderato, L., M.W. Davey, and A.A. Piper, *Demethylation of the human MDR1 5' region accompanies activation of P-glycoprotein expression in a HL60 multidrug resistant subline*. Somat Cell Mol Genet, 1997. 23(6): p. 391-400.
69. Nakayama, M., et al., *Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias*. Blood, 1998. 92(11): p. 4296-307.
70. Kantharidis, P., et al., *Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance*. Clin Cancer Res, 1997. 3(11): p. 2025-32.
71. Tada, Y., et al., *MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment*. Clin Cancer Res, 2000. 6(12): p. 4618-27.
72. Yatouji, S., et al., *Differential modulation of nuclear texture, histone acetylation, and MDR1 gene expression in human drug-sensitive and -resistant OV1 cell lines*. Int J Oncol, 2007. 30(4): p. 1003-9.
73. Zhang, Y., et al., *Silencing the EZH2 gene by RNA interference reverses the drug resistance of human hepatic multidrug-resistant cancer cells to 5-Fu*. Life Sci, 2013. 92(17-19): p. 896-902.
74. Jin, S. and K.W. Scotto, *Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y*. Mol Cell Biol, 1998. 18(7): p. 4377-84.
75. Toth, M., I.M. Boros, and E. Balint, *Elevated level of lysine 9-acetylated histone H3 at the MDR1 promoter in multidrug-resistant cells*. Cancer Sci, 2012. 103(4): p. 659-69.
76. David, G.L., et al., *MDR1 promoter hypermethylation in MCF-7 human breast cancer cells: changes in chromatin structure induced by treatment with 5-Aza-cytidine*. Cancer Biol Ther, 2004. 3(6): p. 540-8.
77. Jones, P.L., et al., *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet, 1998. 19(2): p. 187-91.

78. El-Osta, A., et al., *Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation*. Mol Cell Biol, 2002. 22(6): p. 1844-57.
79. Chen, M., et al., *Expression and promoter methylation analysis of ATP-binding cassette genes in pancreatic cancer*. Oncol Rep, 2012. 27(1): p. 265-9.
80. Baker, E.K., et al., *Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs*. Oncogene, 2005. 24(54): p. 8061-75.
81. Weichert, W., *HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies*. Cancer Lett, 2009. 280(2): p. 168-76.
82. Ververis, K., et al., *Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents*. Biologics, 2013. 7: p. 47-60.
83. Marks, P.A., *HDAC inhibitors: much to learn about effective therapy*. Oncology (Williston Park), 2010. 24(2): p. 185, 188.
84. Dickinson, M., R.W. Johnstone, and H.M. Prince, *Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect*. Invest New Drugs, 2010. 28 Suppl 1: p. S3-20.
85. Piekarz, R.L. and S.E. Bates, *Epigenetic modifiers: basic understanding and clinical development*. Clin Cancer Res, 2009. 15(12): p. 3918-26.
86. Chen, C.L., et al., *Valproic acid inhibits invasiveness in bladder cancer but not in prostate cancer cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 319(2): p. 533-42.
87. Lee, J.H., et al., *Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(33): p. 14639-44.
88. Bolden, J.E., et al., *HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses*. Cell Death Dis, 2013. 4: p. e519.
89. Mann, B.S., et al., *FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. Oncologist, 2007. 12(10): p. 1247-52.
90. Campas-Moya, C., *Romidepsin for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma*. Drugs Today (Barc), 2009. 45(11): p. 787-95.
91. Munster, P., et al., *Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study*. J Clin Oncol, 2007. 25(15): p. 1979-85.
92. Braithe, F., et al., *Phase I study of epigenetic modulation with 5-azacytidine and valproic acid in patients with advanced cancers*. Clin Cancer Res, 2008. 14(19): p. 6296-301.
93. Zhang, X., et al., *The discovery of colchicine-SAHA hybrids as a new class of antitumor agents*. Bioorg Med Chem, 2013. 21(11): p. 3240-4.
94. Robey, R.W., et al., *Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance*. Mol Pharm, 2011. 8(6): p. 2021-31.
95. Fedier, A., et al., *The histone deacetylase inhibitors suberoylanilide hydroxamic (Vorinostat) and valproic acid induce irreversible and MDR1-independent resistance in human colon cancer cells*. Int J Oncol, 2007. 31(3): p. 633-41.
96. Mickley, L.A., et al., *Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents*. J Biol Chem, 1989. 264(30): p. 18031-40.
97. Tabe, Y., et al., *Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells*. Blood, 2006. 107(4): p. 1546-54.

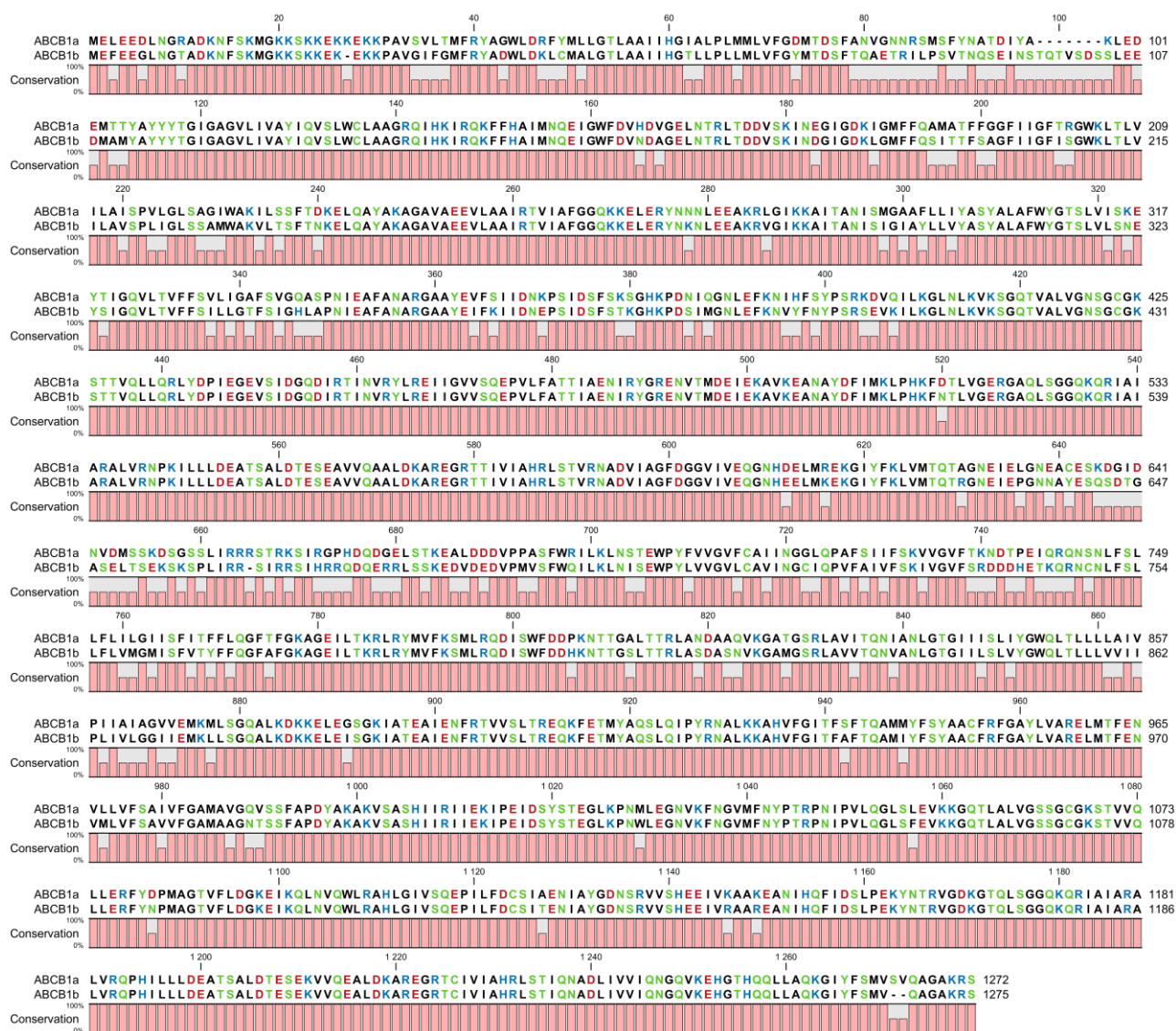
98. Kim, Y.K., et al., *Histone deacetylase inhibitor apicidin-mediated drug resistance: involvement of P-glycoprotein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 368(4): p. 959-64.
99. Eyal, S., et al., *The antiepileptic and anticancer agent, valproic acid, induces P-glycoprotein in human tumour cell lines and in rat liver*. *Br J Pharmacol*, 2006. 149(3): p. 250-60.
100. Kim, S.N., et al., *Histone deacetylase inhibitor induction of P-glycoprotein transcription requires both histone deacetylase 1 dissociation and recruitment of CAAT/enhancer binding protein beta and pCAF to the promoter region*. *Mol Cancer Res*, 2009. 7(5): p. 735-44.
101. Xu, Y., et al., *Role for Class I histone deacetylases in multidrug resistance*. *Exp Cell Res*, 2012. 318(3): p. 177-86.
102. Ruefli, A.A., et al., *The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(19): p. 10833-8.
103. Castro-Galache, M.D., et al., *Susceptibility of multidrug resistance tumor cells to apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors*. *Int J Cancer*, 2003. 104(5): p. 579-86.
104. El-Khoury, V., et al., *The histone deacetylase inhibitor trichostatin A downregulates human MDR1 (ABCB1) gene expression by a transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model*. *Br J Cancer*, 2007. 97(4): p. 562-73.
105. Hsu, S.I., L. Lothstein, and S.B. Horwitz, *Differential overexpression of three mdr gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique mdr genes*. *J Biol Chem*, 1989. 264(20): p. 12053-62.
106. Cohen, D., et al., *Structural and functional analysis of the mouse mdr1b gene promoter*. *J Biol Chem*, 1991. 266(4): p. 2239-44.
107. Croop, J.M., et al., *The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues*. *Mol Cell Biol*, 1989. 9(3): p. 1346-50.
108. Pirity, M., A. Hever-Szabo, and A. Venetianer, *Overexpression of P-glycoprotein in heat- and/or drug-resistant hepatoma variants*. *Cytotechnology*, 1996. 19(3): p. 207-14.
109. Hever-Szabo, A., et al., *P-glycoprotein is overexpressed and functional in severely heat-shocked hepatoma cells*. *Anticancer Res*, 1998. 18(4C): p. 3045-8.
110. Fazlina, N., et al., *Assessment of P-gp and MRP1 activities using MultiDrugQuant Assay Kit: a preliminary study of correlation between protein expressions and its functional activities in newly diagnosed acute leukaemia patients*. *Malays J Pathol*, 2008. 30(2): p. 87-93.
111. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
112. Rajagopal, A., et al., *In vivo analysis of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) activity using transient expression of fluorescently tagged MRP1*. *Cancer Research*, 2002. 62(2): p. 391-6.
113. Hollo, Z., et al., *Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1191(2): p. 384-8.

114. Schwab, D., et al., *Comparison of in vitro P-glycoprotein screening assays: recommendations for their use in drug discovery*. J Med Chem, 2003. 46(9): p. 1716-25.
115. Shen, D.W., et al., *Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification*. Science, 1986. 232(4750): p. 643-5.
116. Nishida, H., et al., *Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell*. Chromosome Res, 2006. 14(2): p. 203-11.
117. Mickley, L.A., et al., *Gene rearrangement: a novel mechanism for MDR-1 gene activation*. J Clin Invest, 1997. 99(8): p. 1947-57.
118. Teeter, L.D., et al., *Activation of distinct multidrug-resistance (P-glycoprotein) genes during rat liver regeneration and hepatocarcinogenesis*. Mol Carcinog, 1993. 8(2): p. 67-73.
119. Fardel, O., V. Lecureur, and A. Guillouzo, *Regulation by dexamethasone of P-glycoprotein expression in cultured rat hepatocytes*. FEBS Lett, 1993. 327(2): p. 189-93.
120. Maier, T., M. Guell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. FEBS Lett, 2009. 583(24): p. 3966-73.
121. Raymond, M., et al., *Physical mapping, amplification, and overexpression of the mouse *mdr* gene family in multidrug-resistant cells*. Mol Cell Biol, 1990. 10(4): p. 1642-51.
122. Stein, U., W. Walther, and V. Wunderlich, *Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs*. Eur J Cancer, 1994. 30A(10): p. 1541-5.
123. Rund, D., I. Azar, and O. Shperling, *A mutation in the promoter of the multidrug resistance gene (MDR1) in human hematological malignancies may contribute to the pathogenesis of resistant disease*. Adv Exp Med Biol, 1999. 457: p. 71-5.
124. Van Lint, C., S. Emiliani, and E. Verdin, *The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation*. Gene Expr, 1996. 5(4-5): p. 245-53.
125. Lee, H., et al., *Expression profile analysis of trichostatin A in human gastric cancer cells*. Biotechnol Lett, 2002. 24(5): p. 377-381.

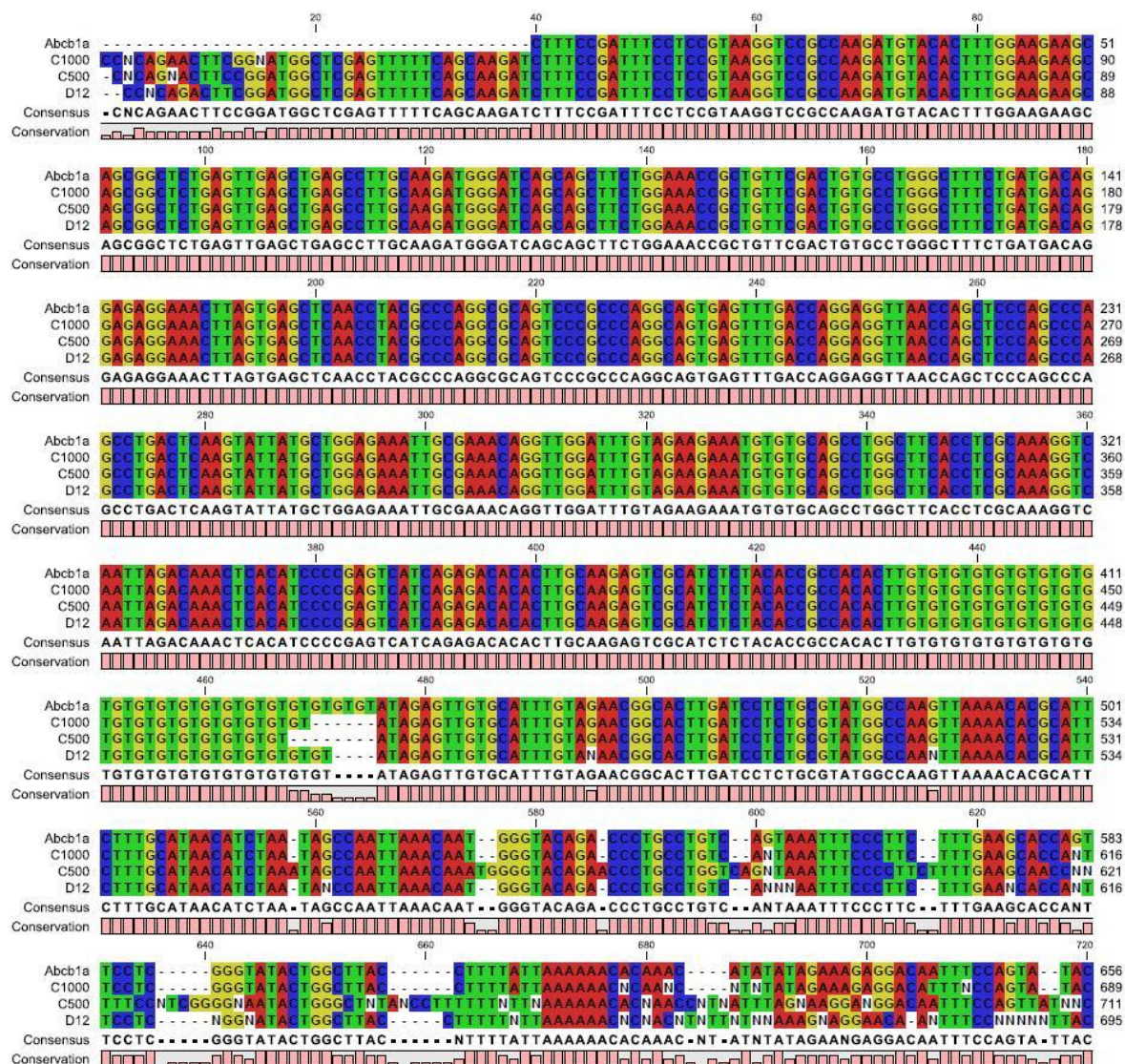
TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Ádám Sike**^{1*}, Enikő Nagy^{1*}, Balázs Vedelek¹, Dávid Pusztai¹, Anikó Venetianer³ and Imre M. Boros^{1, 2, #} **mRNA levels of related *Abcb* genes change opposite to each other upon histone deacetylase inhibition in drug-resistant rat hepatoma cells**
PLOS ONE
2. Ildikó Huliák^{1*}, **Ádám Sike**^{1*}, Sevil Zencir^{2*} and Imre M. Boros^{1, 3, #} **The objectivity of reporters: interference between physically unlinked promoters affects reporter gene expression in transient transfection experiments** DNA and Cell Biology
3. Sevil Zencir*, **Adam Sike**[†], Melanie Dobson[‡], Ferhan Ayaydin[§], Imre Boros^{†, ||, 1}, and Zeki Topcu^{¶, 1} **Identification of transcriptional and phosphatase regulators as interaction partners of human ADA3, a component of histone acetyltransferase complexes** BJ Gene

FÜGGELÉK



1. Függelék Az ABCB1a és ABCB1b fehérjék szekvenciáinak összehasonlítása. Az egyes aminosavak jelölése: zöld: neutrális, poláris; fekete: neutrális, nem-poláris; piros: savas, poláris; kék: bázikus, poláris.



2.A Függelék Az *Abcb1a* gén megelőző szabályozó szekvenciák összehasonlítása. A szekvencia adatok az irodalmi adathoz is illeszkednek.

